

**ПОЛЯНСКАЯ  
Галина Георгиевна**

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ КАРИОТИПИЧЕСКОЙ  
ИЗМЕНЧИВОСТИ  
В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ПРИ  
ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В  
РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ**

03.00.25 - Клеточная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**доктора биологических наук**

**Санкт-Петербург  
2000**



Работа выполнена в Институте цитологии РАН,  
Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
профессор, **Ю. Б. Вахтин**,  
Институт цитологии РАН,  
Санкт-Петербург

доктор биологических наук,  
**В. Т. Какпаков**,  
Институт общей генетики  
им. Н. И. Вавилова РАН,  
Москва

доктор биологических наук,  
**И. Е. Воробцова**,  
Центральный  
научно-исследовательский  
рентгено-радиологический  
институт МЗ РФ,  
Санкт-Петербург

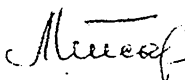
Ведущее учреждение: Петербургский институт  
ядерной физики РАН

Защита состоится «31» мая 2000 года в 13 часов на заседании  
Диссертационного совета Д.002.73.01 Института цитологии РАН по  
адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке  
Института цитологии РАН

Автореферат разослан «28» апреля 2000 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
доктор биологических наук

 Л. Н. ПИСАРЕВА

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Кариотипическая изменчивость клеток имеет место как *in vivo*, так и *in vitro*. Кариотипическая изменчивость в большой степени обуславливает протекание эволюционных процессов в природе. Те же процессы, т.е. количественные и структурные изменения в кариотипе, могут вызывать наследственные болезни и развитие новообразований. В практических биомедицинских исследованиях индукция кариотипических изменений является тестом на мутагенность и канцерогенность окружающей среды. Очевидно, что изучение закономерностей кариотипической изменчивости является актуальной проблемой современной клеточной биологии.

Цитогенетические процессы и, в частности, кариотипическая изменчивость в нормальных клеточных популяциях *in vivo* находятся под постоянным контролем интегральных систем организма и обусловлены межклеточными и межклеточными взаимодействиями. Степень кариотипической изменчивости контролируется стабилизирующим отбором [1-7]. При переходе клеток в состояние *in vitro* основными типами клеточного взаимодействия в популяциях становятся физический контакт между клетками и связь через метаболиты в ростовой среде. Эти взаимодействия объединяют клетки, составляющие клеточную популяцию, в единую автономную систему, поддерживаемую благодаря существованию между клетками "метаболической кооперации" [8-11]. Образование постоянных клеточных линий, т.е. приобретение клетками свойства иммортализации, связано со многими генетическими и цитогенетическими изменениями в клеточных популяциях [12-17]. Несмотря на то, что при переходе клеток в состояние *in vitro* изменяются многие функции, свойственные клеткам в условиях организма, потенции клеток к воссозданию первоначальных свойств остаются, а в некоторых клеточных линиях ряд свойств сохраняется ([2, 10, 18, 19]; Malpoix, Poljanskaya, 1979). Некоторые закономерности кариотипической изменчивости клеток в культуре также сходны с таковыми в условиях организма [5, 7, 20-22]. Клеточная популяция *in vitro* как автономная система имеет и свои особенности по сравнению с организмом. Для ее выживания необходимо образование сбалансированной кариотипической структуры, которой характеризуется стадия стабилизации клеточной линии [22-25].

Большинство клеточных линий на этапе стабилизации характеризуется наличием в кариотипе перестроенных по сравнению с донором постоянных маркерных хромосом ("маркерные" линии). Меньшая часть известных постоянных клеточных линий не имеет таких хромосом в составе кариотипа ("безмаркерные" линии). Кариотипы этих линий либо соответствуют донорам, либо отличаются от них количеством гомологичных хромосом. Подобно "маркерным" линиям, они могут иметь разную степень трансформированности ([26-30]; Полянская, 1988; 1989; Полянская, Фридлянская, 1991). Существование разных кариотипических вариантов постоянных клеточных линий позволяет предположить, что хромосомные aberrации, обеспечивающие образование маркеров, являются лишь одним из инструментов, с помощью которых достигается необходимый для существования клеточной популяции генный баланс. Таким образом, при стабилизации постоянной кле-

точной линии должны существовать определенные ограничения кариотипической изменчивости, обуславливающие сбалансированную генетическую структуру. Есть ряд данных, подтверждающих это предположение [32-34]. Тем не менее состояние данной проблемы требует, несомненно, расширения исследований по поиску закономерностей ограничений кариотипической изменчивости.

Клеточные популяции *in vitro* являются динамичными системами и, лишившись многоступенчатого организменного контроля, в значительной степени подвержены влиянию внешних факторов, которые способствуют, в частности, усилению кариотипической изменчивости, что может повлечь за собой изменение других клеточных свойств. Для большинства постоянных клеточных линий, по-видимому, наиболее адекватным путем установления нового генного баланса при варьировании условий культивирования являются структурные и количественные изменения в составе маркерных хромосом. Отсутствие маркеров в ряде клеточных линий, возможно, обуславливает отличные от "маркерных" линий закономерности кариотипической изменчивости в процессе культивирования клеточных линий, находящихся на стадии стабилизации. Ряд немногочисленных данных литературы [35-40] свидетельствует, что при некоторых, совершенно разных воздействиях и в разных "безмаркерных" линиях отмечается появление дицентриков, образованных на основе теломерных ассоциаций. В связи с этим нам представлялось существенным провести детальное исследование кариотипической изменчивости в таких линиях при расширении спектра воздействий и круга объектов.

## **ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Цель настоящей работы - поиск и исследование закономерностей структурной и количественной кариотипической изменчивости, преимущественно в "безмаркерных" клеточных линиях, при длительном культивировании их в разных условиях.

Были поставлены следующие задачи: 1) Анализ структурной и количественной кариотипической изменчивости в "безмаркерных" клеточных линиях при действии факторов, как правило присутствующих при длительном культивировании, а также факторов, влияющих на жизнедеятельность клеток. 2) Анализ структурной и количественной кариотипической изменчивости в различных по степени трансформированности "безмаркерных" клеточных линиях при одинаковом воздействии - микоплазменной контаминации. 3) Сравнение характера кариотипической изменчивости в "безмаркерных" и "маркерных" клеточных линиях при одинаковом воздействии - микоплазменной контаминации. 4) Поиск закономерностей ограничений кариотипической изменчивости, обеспечивающих сбалансированность кариотипической структуры "безмаркерных" и "маркерных" клеточных линий на этапе стабилизации.

## **НАУЧНАЯ НОВИЗНА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Впервые показано, что дицентрики, образованные на основе теломерных ассоциаций, являются характерной чертой кариотипической изменчивости в "безмаркерных" клеточных линиях при длительном культивирова-

нии в разных условиях. Определен ряд общих свойств дицентриков. Представленные результаты впервые позволили предположить особую роль дицентриков для “безмаркерных” линий, связанную с созданием генетических структур, обеспечивающих систему адаптации клеточной популяции как автономного образования к условиям существования *in vitro*.

Впервые проведен статистический анализ отклонений по числу индивидуальных хромосом от их количества в основном структурном варианте кариотипа (СВК) и корреляции между разными хромосомами при одновременных однонаправленных и разнонаправленных отклонениях для поиска закономерностей ограничений количественной кариотипической изменчивости, обуславливающих образование сбалансированной кариотипической структуры в “безмаркерных” и “маркерных” клеточных линиях. Установлено, что для выживания клеточной популяции *in vitro* необходимо существование в ней в определенном соотношении клеток с разными СВК; выявлены конкретные закономерности этого явления.

Впервые обнаружены корреляции между статистически выявленными и морфологически выраженными закономерностями кариотипической изменчивости. На основе этих данных выдвинуто предположение, что закономерности количественной изменчивости, установленные при анализе СВК, и тенденции морфологических изменений кариотипа (дицентрики на основе теломерных ассоциаций) представляют собой проявления единой клеточно-популяционной функции.

Результаты проведенного исследования значительно расширили представления о закономерностях структурной и количественной кариотипической изменчивости в постоянных клеточных линиях. Существенный вклад, внесенный в решение фундаментальных проблем клеточной биологии, состоит в том, что впервые клеточные линии, не имеющие маркерных хромосом, были рассмотрены как особые биологические системы и получены результаты, подтверждающие наличие характерных кариотипических особенностей этих линий.

## НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Полученные данные по кариотипической изменчивости в клеточных линиях при длительном культивировании в разных условиях показали необходимость периодического проведения цитогенетического контроля в клеточных культурах. Так, данные, касающиеся восстановительных процессов в клетках после размораживания, связанные с репарацией и репликацией, свидетельствуют о нестабильности клеточной культуры сразу после декриоконсервации, что необходимо учитывать при постановке экспериментов. Необходимо стремиться к минимальному по времени контакту клеток с DMSO после декриоконсервации в связи с установленной цито- и генотоксичностью препарата. Перевод клеток на другую среду, качество сыворотки могут изменять кариотипическую структуру клеточной популяции при длительном культивировании, что может привести к изменению других свойств линии, изучаемых как в фундаментальных, так и в прикладных работах. Необходима периодическая проверка присутствия микоплазмы в культурах, т.к. по мере удлинения срока контаминации могут происходить существенные кариотипические изменения, не проявляющиеся на ранних сроках. Дицентрики, появляющиеся часто раньше других типов аберраций в

“безмаркерных” линиях, по-видимому, могут служить показателем неблагоприятных условий культивирования.

Результаты работы могут быть использованы в учебных целях.

## АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Материалы диссертации представлялись на Всесоюзном симпозиуме “Генетические процессы в популяциях опухолевых клеток” (Ленинград, 1980); на объединенном Конгрессе ETCS и EURES (Будапешт, 1983); на Всесоюзных (Российских) конференциях “Биология клетки в культуре” (Ленинград, 1987; Пущино, 1990, 1994; Санкт-Петербург, 1992, 1995, 1998); на 2-й Всесоюзной конференции “Геном человека - 91” (Переяславль-Залесский, 1991); на Международном симпозиуме по микоплазмам (Брно, 1992, Чехословакия); на 7-м Международном Конгрессе по клеточным коллекциям (Китай, 1992); на 10-м Международном Конгрессе по микоплазмологии (Бордо, 1994, Франция); на 39-м ежегодном собрании Американского общества клеточных биологов (Вашингтон, 1999, США); на 2-м съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 2000).

## СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ

Диссертация изложена на 300 стр. машинописного текста и иллюстрирована 61 таблицей и 39 рисунками. Материалы диссертации отражены в 34 публикациях в отечественных и международных журналах, в том числе в обзорной работе.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Материалы и методы

#### 1.1. Материалы

В работе были использованы следующие клеточные линии:

1) Иммуortalизованная линия фибробластов кожи индийского мунджака *Muntjac muntjak*, М - аббревиатура собственная ([30, CCL157]; Каталог РККК, 1999). Кариотип этой линии идентичен кариотипу донора (рис. 1а). Сублинии МТ, М1, М2 (рис. 1б, 2), спонтанно образовавшиеся из линии М (Полянская, 1988, Полянская, Фридлянская, 1991, Freedlanskaya et al., 1992); сублиния М<sub>1</sub> в отличие от перечисленных выше, не имела четко выраженное модальное число хромосом, наиболее часто встречались клетки с 6, 7 и 10 хромосомами (Полянская и др., 1993) 2) Иммуortalизованная линия клеток почки кенгуровой крысы *Potorous tridactylis*, NBL-3-11

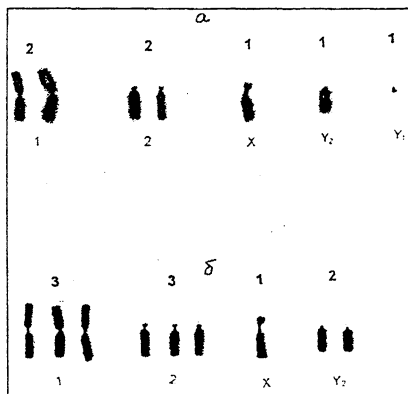


Рис. 1. Основные структурные варианты кариотипов (СВК) клеток М (а): 2+2+1+1+1 и сублинии МТ (б): 3+3+1+2.

Арабские цифры (нижние) - номера хромосом; латинские буквы - номенклатура половых хромосом. Арабские цифры (верхние) - число гомологичных хромосом одного морфологического типа, составляющих СВК.

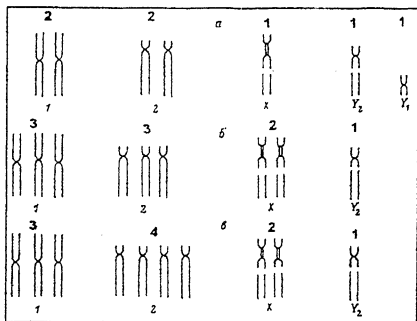


Рис. 2. Основные структурные варианты кариотипов (СВК) клеток М (а): 2+2+1+1+1 и сублиний М1 (б): 3+3+2+1, М2 (в): 3+4+2+1.

Обозначения те же, что на рис. 1.

тайского хомячка, V-79 (Каталог РККК, 1999). Количество маркеров - 11 (Полянская, Ефремова, 1993). 6) Клональные клеточные линии 2с-16 и 2с-11, выделенные из иммортализованной линии яичника китайского хомячка, А14-2с-1. Количество маркеров - 14 и 15, соответственно (Полянская и др., 1981). 7) Иммортализованная клеточная линия карциномы шейки матки человека М HeLa clone 11. (Каталог РККК, 1999). Количество маркеров - 13. 8) Клеточные гибриды: между иммортализованной линией эмбриональных фибробластов мыши (N1Н3Т3) и клоном (JF1) иммортализованной линии клеток саркомы крысы Jensen Sarcoma, ауksотрофными по аспарагину (Каталог РККК, 1999); между клетками сублиний М1, М2 и JF1.

Все перечисленные клеточные культуры получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН.

## 1.2. Методы

### 1.2.1. Культивирование клеток.

Клетки культивировали на средах, как правило рекомендованных в Каталогах коллекций клеточных культур ([30]; Каталог РККК, 1999). Используемые в работе среды: ЕМЕМ (минимальная среда Игла), DMEM (среда Игла в модификации Дальбекко), F12 (среда Хэма), DMEM/F12 с добавлением в них 10% эмбриональной бычьей сыворотки.

([30, CCL 35]; Каталог РККК, 1999). Кариотип этой линии соответствует кариотипу донора за исключением моносомии по аутосоме 5 (рис. 3а). Сублиния NBL-3-17 (рис. 3б), спонтанно образовавшаяся из NBL-3-11 (Полянская, 1988; Каталог РККК, 1999). 3) Иммортализованная линия клеток лейомиосаркомы человека, SK-UT-1В ([30, НТВ 115; Каталог РККК, 1999). Кариотип соответствует кариотипу человека [29]. 4) Неиммортализованная клеточная линия легкого эмбриона человека, MRC-5 ([30, CCL 171]; Каталог РККК, 1999). 5) Иммортализованная линия клеток легкого кита-

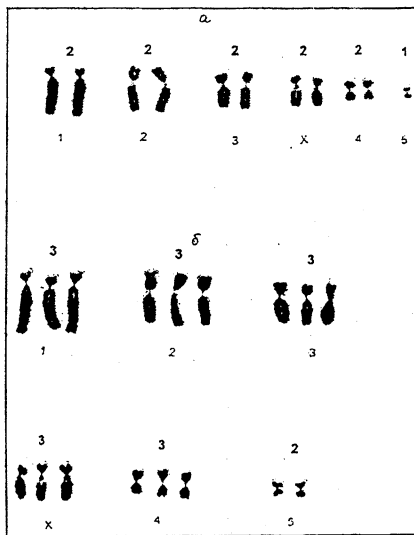


Рис. 3. Основные структурные варианты кариотипов (СВК) клеток линии NBL-3-11 (а): 2+2+2+2+2+1 и сублинии NBL-3-17 (б): 3+3+3+3+3+2.

Обозначения те же, что на рис. 1.

**1.2.2. Получение клеточных гибридов.** Клеточный гибрид между клетками N1H3T3 и JF1 и клеточные гибриды между клетками M1, M2 и JF1 получали при обработке культур в течение 1 мин 1 мл 45% раствора полиэтиленгликоля, содержащего 10% DMSO. Принципиальное отличие гибридов M1xJF1 и M2xJF1 от гибрида N1H3T3xJF1 состояло в том, что после гибридизации в первом случае суспензию клеток высевали без клонирования на среду без аспарагина. При таких условиях селекции в массовой культуре росли гибридные клетки и родительские клетки мунтжака. Это позволило оценить в равных условиях культивирования цитогенетические характеристики в родительских и гибридных клетках.

**1.2.3. Кариологический анализ.** Для кариологического анализа использовали метафазный метод. Препараты метафазных хромосом получали общепринятым методом (Полянская, 1988). Хромосомы окрашивали тремя способами: рутинная окраска раствором красителя Гимзы (1:50); дифференциальная окраска для выявления G-дисков ([41]; Глебов и др., 1981); дифференциальная окраска для выявления C-дисков по модифицированному методу Самнера [42]. Используемые модификации касались, главным образом, времени обработок разных клеток. Кариологический анализ проводили как на цитологических препаратах, так и на микрофотографиях. При анализе дифференциально окрашенных хромосом просматривали от 15 до 50 метафазных пластинок в зависимости от поставленной цели. Основными задачами, которые решались при анализе дифференциально окрашенных хромосом, были: характеристика кариотипа ряда интактных и подвергнутых воздействию клеточных культур; локализация aberrаций в идентифицированных хромосомах. При анализе рутинно окрашенных хромосом было просмотрено от 100 до более 2000 метафазных пластинок в зависимости от цели эксперимента. Были исследованы количество, типы хромосомных aberrаций и анеуплоидия. При изучении анеуплоидии исследовалось распределение клеток по числу хромосом, состав и количество разных структурных вариантов кариотипа (СВК). В формуле СВК указано количество гомологичных хромосом разных морфологических типов или количество хромосом в разных морфологических группах. Основной СВК - наиболее часто встречающийся СВК в клетках с модальным числом хромосом. На рис. 1-3 приведены примеры нескольких основных СВК для разных сублиний фибробластов кожи индийского мунтжака и почки кенгуровой крысы.

**1.2.4. Используемые в работе воздействия (факторы), изменяющие условия культивирования и способствующие кариотипической нестабильности.**

1. Влияние разной генотипической среды на кариотипическую изменчивость в клетках мунтжака. Кариологический анализ (количество, типы, локализация хромосомных aberrаций и степень анеуплоидии) в клеточных гибридах M1xJF1 и M2xJF1 проводили при дробной фиксации клеток в течение 27 - 128 сут после их получения.

2. Влияние разных культуральных сред на количественную кариотипическую изменчивость в сублинии NBL-3-17. (используемые среды: НМЕМ - минимальная Игла на растворе Хэнкса, ЕМЕМ - та же среда на растворе Эрла и F12) Кариологический анализ проводили через 30 и 60 сут после посева на указанные среды (Полянская, Дьяконова, 1988).

3. Влияние антибиотиков на кариотипические характеристики в клетках



М и МТ. Была использована смесь: гентамицин, стрептомицин и пенициллин, каждый в концентрации 100 мкг/мл - "терапевтическая" доза, применяемая для предотвращения микробной инфекции [43]. Антибиотики вводили тремя способами: в культуру М сразу после декриоконсервации; через 60 сут после нее; в культуру МТ через 60 сут после декриоконсервации. Кариологический анализ проводили через 30 и 60 сут после введения в среду антибиотиков.

4. Влияние криоконсервации на цитогенетические процессы. Были изучены выживаемость, внеплановый синтез ДНК и количество хромосомных aberrаций в клеточной сублинии МТ в разные сроки после криоконсервации, проводимой в присутствии или в отсутствие криопротектора диметилсульфоксида (DMSO - фирма Fluka), а также влияние DMSO без криоконсервации на количество хромосомных aberrаций. Опыты по криоконсервации проводили на программном замораживателе типа ЗПБ-1. Декриоконсервацию осуществляли путем отогрева в аппарате РТ-3 при 40°C в течение 80 с. Среднее время контакта клеточной культуры с DMSO при комнатной температуре в процессе криоконсервации - декриоконсервации составляло около двух часов. Выживаемость клеток определяли с помощью трипанового синего, в каждом варианте просчитывали по 100 клеток. Определение внепланового синтеза ДНК проводили через 3-5 ч и 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13 и 15 сут после декриоконсервации. Внеплановый синтез ДНК исследовали методом автордиографии с помощью <sup>3</sup>H-тимидина (уд. акт. 0.79 ТБк/ммоль). Изотоп вводили в среду в концентрации 37.0x10<sup>4</sup> МБк/мл и инкубировали в течение 1 ч. Отмывку от изотопа проводили в растворе Хенкса с холодным тимидином и фиксировали клетки в смеси Карнуа. Препараты покрывали эмульсией Р и выдерживали в холодильнике до 1.5 мес. При микрофотографировании клетки разделяли на три группы: сильно меченые (свыше 70 зерен над ядром), слабо меченые (11 - 70 зерен) и немеченые (5 - 10 зерен над ядром, фон). Показателем внепланового синтеза ДНК служило увеличение числа слабо меченых клеток за счет уменьшения числа немеченых без заметного уменьшения числа сильно меченых клеток. В каждом варианте просчитывали 1000 - 2000 клеток при двух - трех повторностях. Для изучения влияния криоконсервации и DMSO на количество и типы хромосомных aberrаций были использованы следующие варианты опыта: 1) криоконсервация и хранение в жидком азоте без DMSO и с DMSO в течение 7 сут и последующий кариологический анализ через 3 и 7 сут после декриоконсервации; 2) криоконсервация и хранение в жидком азоте без DMSO и с DMSO в течение 6 мес и последующий кариологический анализ через 3 сут; 3) введение DMSO на 2 ч с последующей отмывкой и фиксацией клеток через 23 ч после начала воздействия (введение DMSO в клеточную культуру осуществляли двумя способами: в распластанную, рутинно ведущуюся культуру и в суспензию, для точного моделирования процедуры подготовки к криоконсервации). Всем исследованным вариантам сопутствовал интактный контроль, культивируемый в течение 60 - 64 сут после декриоконсервации.

5. Влияние эмбриональной бычьей сыворотки разных серий при варьировании концентраций на кариотипическую изменчивость в клеточных культурах М и М<sub>1</sub> Были добавлены в культуральную среду сыворотка серии 181, производства НИИ эпидемиологии и микробиологии (Минск) и сыво-

ротка серии 33, производства Института эпидемиологии и микробиологии (Москва). Каждую сыворотку добавляли в среду в концентрации 10 и 3%. С целью повышения жизнеспособности и скорости пролиферации клеток при употреблении 3% сыворотки в среду в оптимальных концентрациях вводили компоненты (добавки), частично заменяющие сыворотку [44].

6. Влияние микоплазменной контаминации на кариотипическую изменчивость в клеточных культурах: M, NBL-3-17, NBL-3-11, SK-UT-1B, MRC-5, V-79, M HeLa clone 11. Было проведено искусственное заражение культур двумя видами микоплазм: *Mycoplasma arginini R-16* (аргининозависимая) и *Acholeplasma laidlawii A, штамм PG-8* (глюкозозависимая). Контаминацию проводили при полном монослое культуры с исходным титром для *M. arginini*  $2 \times 10^6$  колонеобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл, для *A. laidlawii* -  $2 \times 10^{10}$ . Первое определение наличия микоплазмы в культуре проводили через 2 пассажа (10 -15 сут) после заражения и перед каждой фиксацией клеток двумя методами: окраской флуорохромом Хехст - Н-33258 [45] и микробиологическим высевом на твердые и жидкие питательные среды для микоплазм. Титр микоплазм устанавливали при высеве культуральной пробы контаминированных клеток на твердый агар PPLO. Кариологический анализ проводили при дробной фиксации клеток в процессе длительной микоплазменной контаминации в течение 15 - 168 сут. Сроки исследования в указанных пределах варьировали между перечисленными выше культурами. Кариологический анализ проводили также при деконтаминации от микоплазм клеточных культур M и V-79 с помощью антибиотика ципрофлоксацина (ЦФ) при использовании двух методов [46,47].

7. Влияние ЦФ на кариотипическую изменчивость в клеточных культурах NBL-3-11 и M. Клетки подвергали кратковременному и длительному действию ЦФ в концентрациях 10, 25, 50 и 100 мкг/мл. Учитывая данные о длительности фаз клеточного цикла исследуемых линий [48], в опытах с кратковременным действием ЦФ на клетки его добавляли в ростовую среду в разные фазы 1-го митотического цикла и в конце 2-го цикла. А именно, в культуры клеток NBL-3-11 – за 6,5, 18,5, 24,5 и 48 ч до их фиксации; в культуры фибробластов мунтжака – за 6, 15, 24 и 48 ч до фиксации. В опытах с длительным действием ЦФ его добавляли в ростовую среду в течение 15 и 30 сут, предшествующих фиксации клеток.

8. Влияние внеклеточного белка теплового шока (в-БТШ70) на хромосомную изменчивость в клеточной линии M. В интактные и обработанные ЦФ в концентрации 50 мкг/мл клеточные культуры вводили в-БТШ70. ЦФ добавляли в ростовую среду в разные фазы 1-го митотического цикла: за 6 и 24 ч до фиксации клеток, а также на 6 ч с последующим культивированием в течение 18 ч (до фиксации) на чистой среде. Клетки подвергали действию в-БТШ70 в концентрациях 10 и 100 мкг/мл при введении его в культуру за 24 ч до фиксации. Введение в-БТШ70 в концентрации 100 мкг/мл проводили также за 6 ч до фиксации и на 6 ч с последующим культивированием в течение 18 ч (до фиксации) на чистой среде. Совместное культивирование клеток с ЦФ и в-БТШ70 (50 и 100 мкг/мл) проводили: 1) в течение 6 и 24 ч до фиксации; 2) при введении агентов на 6 ч с последующим культивированием в течение 18 ч на чистой среде до фиксации; 3) при введении ЦФ за 24 ч до фиксации, а в-БТШ70 - только на последние 6 ч перед фиксацией. Клетки

подвергали действию денатурированного в-БТШ70, который вводили в культуру за 6 ч (100 мкг/мл) и за 24 ч (50 и 100 мкг/мл) до фиксации, а также на 6 ч (100 мкг/мл) с последующим культивированием в течение 18 ч на чистой среде. Совместное культивирование клеток с ЦФ и денатурированным в-БТШ70 при концентрации белка 50 и 100 мкг/мл проводили в тех же условиях, что и с нативным в-БТШ70. Липополисахарид (ЛПС), полученный из *E. coli* (Sigma), в концентрации 50 мкг/мл вводили в культуру за 24 ч до фиксации. Совместное культивирование клеток с ЛПС и в-БТШ70 в концентрации 100 мкг/мл также проводили в течение 24 ч до фиксации.

БТШ70 выделяли из скелетных мышц крупного рогатого скота методом двухступенчатой очистки с использованием ионообменной и аффинной хроматографии [49]. Чистоту препарата определяли методом электрофореза в денатурирующих условиях [50]. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [51], в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (Sigma, тип V). Денатурацию белка осуществляли кипячением на водяной бане в течение 10 мин.

**1.2.5. Методы статистического анализа.** Все полученные в работе результаты обрабатывали с использованием  $t$ -критерия Стьюдента и критерия  $\chi^2$ . Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы  $P < 0.01$ . Наиболее широко эти статистические методы были применены при исследовании закономерностей количественной карiotипической изменчивости в клеточных популяциях линий М, МТ, М2, NBL-3-11, 2с-11 и 2с-16). В этих исследованиях принятая нулевая гипотеза состояла в допущении равновероятности численных отклонений любой хромосомы от её количества в основном СВК и случайности корреляций между разными хромосомами при одновременных отклонениях.

## Глава 2. Результаты и обсуждение

### 2.1. Влияние факторов, как правило присутствующих при длительном культивировании, на структурную карiotипическую изменчивость в "безмаркерных" клеточных линиях

**2.1.1. Влияние антибиотиков в "терапевтических" дозах на хромосомные aberrации в клеточных линиях фибробластов кожи индийского мунджака.** При работе с клеточными культурами, особенно при длительном культивировании, во избежание бактериального заражения или для подавления его на начальных стадиях используют антибиотики в дозах, существенно не влияющих на жизнеспособность клеток. С целью изучения возможного влияния антибиотиков в "терапевтических" дозах на карiotипическую изменчивость проанализировали характер их действия на количество и типы хромосомных aberrаций в клеточных линиях М и МТ (Полянская, 1989).

В клетках линии М имеет место достоверное увеличение количества хромосомных aberrаций при действии антибиотиков в течение 30 - 60 сут ( $P < 0,01$ ) сразу после декриоконсервации. Увеличение количества хромосомных нарушений происходит только за счет постепенного повышения уровня дицентриков (рис. 4а и 7). При введении антибиотиков через 60 сут после декриоконсервации и их последующем действии в течение 30 - 60 сут количество хромосомных aberrаций соответствует контролю. Длительность культивирования после декриоконсервации, по-видимому, может определять

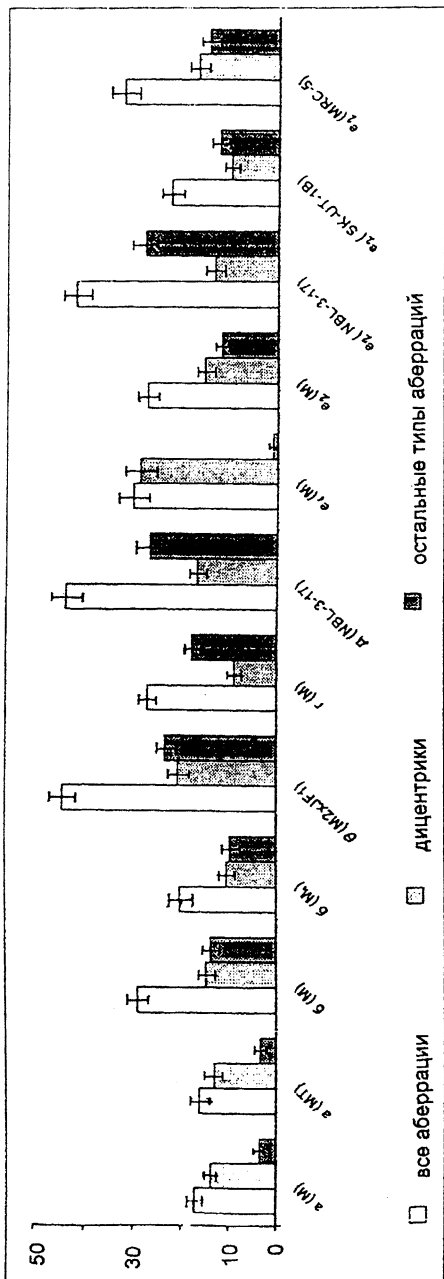


Рис. 4. Количество хромосомных aberrаций в «безмаркерных» клеточных линиях при разных воздействиях в условиях длительного культивирования.

По оси абсцисс: а - «терапевтические» дозы антибиотиков; б - сыворотки; в - клеточные гибриды; г - ципрофлоксацин; д - длительность культивирования; е<sub>1</sub> - микоплазменная контаминация (*M. arginini*); е<sub>2</sub> - микоплазменная контаминация (*A. arginini*); в скобках - аббревиатура линии; по оси ординат: частота встречаемости хромосомных aberrаций, %.

состояние клеточной популяции, и в связи с этим ее кариотипическая структура может по-разному реагировать на применяемые воздействия.

При введении антибиотиков через 60 сут после декриоконсервации и их последующем действии в течение 30 - 60 сут в сублинии МТ в отличие от М имеет место достоверное увеличение количества хромосомных aberrаций за счет постепенного повышения уровня дицентриков (рис. 4а и 7). Следовательно, антибиотики оказывают разное действие на кариотипическую структуру клеток М и МТ при введении их в культуры через 60 сут после декриоконсервации и последующем длительном действии.

При культивировании клеток в течение 30 - 60 сут в обеих линиях имеет место преимущественное вовлечение в образование дицентриков определенных хромосом. В сублинии МТ наиболее часто в образовании дицентриков вовлечены хромосомы 1, 2 и X; в линии М - хромосомы 1, X и Y<sub>1</sub>. В сублинии МТ из 32 проанализированных дицентриков - 28 (87%)

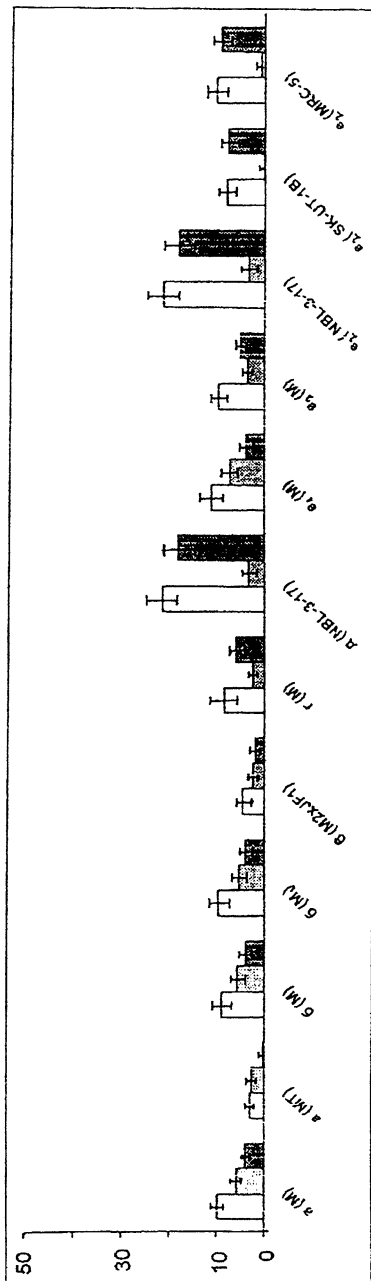


Рис. 5. Количество хромосомных aberrаций в «безмаркерных» клеточных линиях в контрольных вариантах, соответствующих опытным вариантам. Обозначения те же, что на рис. 4.

имеют сочетания - 1+1, 1+2, 1+X, 2+X.; в линии М 70% дицентриков имеют сочетания: 1+X, 1+Y<sub>1</sub>, X+Y<sub>1</sub> (при сравнении с контролем видно, что Y<sub>1</sub> вовлекается в образование дицентриков только при действии антибиотиков). Из приведенных результатов следует, что в обеих линиях дицентрики образуются одинаковыми хромосомами 1 и X, а различия состоят в том, что в МТ еще участвует в дицентриках и хромосома 2, а в М - хромосома Y<sub>1</sub>, отсутствующая в основном СВК линии МТ. Необходимо подчеркнуть, что наблюдаемым дицентрикам не сопутствуют двойные фрагменты. Это позволяет считать, что дицентрики образованы на основе теломерных ассоциаций.

**2.1.2. Влияние криоконсервации на цитогенетические характеристики клеточной сублинии МТ.** Для хранения постоянных клеточных линий применяют криоконсервацию в жидком азоте при использовании криопротекторов, в частности, DMSO. Большинство клеточных линий не может быть заморожено без криопротектора. При последующей декриоконсервации клеточные культуры сохраняют присущие им свойства. В ряде работ отмечена карiotипическая нестабильность, наблюдающаяся в разных линиях в течение некоторого времени после декриоконсервации [52,53]. На нескольких линиях показано, что сразу после декриоконсервации в течение двух недель имеет место усиленный внеплановый синтез ДНК, который при дальнейшем культивировании возвращается к конт-

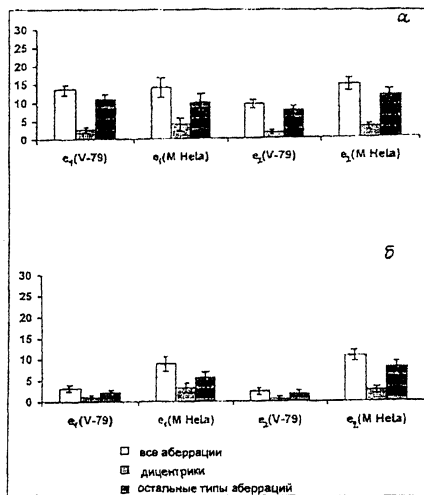


Рис. 6. Количество хромосомных aberrаций в «маркерных» клеточных линиях при длительной микоплазменной контаминации (а) и в соответствующих контрольных вариантах (б).

По оси абсцисс:  $e_1$  - микоплазменная контаминация (*M. arginini*);  $e_2$  - микоплазменная контаминация (*A. arginini*); в скобках - аббревиатура клеточной линии; по оси ординат: частота встречаемости хромосомных aberrаций, %.

сомную изменчивость без криоконсервации (Полянская и др., 1990).

Показано, что после размораживания клеток, криоконсервированных в присутствии 10% DMSO, достоверно уменьшается выживаемость; восстановление её до контрольного уровня происходит через 7 сут. После размораживания клеток, криоконсервированных без DMSO, происходит постепенное восстановление выживаемости, которое достигает контрольного уровня только к 14-м сут. После размораживания клеток, криоконсервированных в присутствии DMSO, достоверно увеличивается внеплановый синтез ДНК, который снижается до уровня контроля к 14-м сут. После размораживания клеток, криоконсервированных без DMSO, также значительно увеличивается внеплановый синтез ДНК, но достоверно меньше, чем в присутствии DMSO. Кроме того, имеет место достоверное снижение интенсивности репликативного синтеза ДНК; восстановление этих синтезов до контрольного уровня происходит к 14-м сут. Следовательно, криопротектор DMSO способствует поддержанию оптимального уровня выживаемости клеток, репарации повреждений и нормальной интенсивности репликации ДНК, которые нарушаются при глубоком замораживании клеток в жидком азоте.

После размораживания клеток, криоконсервированных без DMSO, через 3 сут имеет место достоверное увеличение количества aberrаций, в основном за счет хромосомных разрывов, по сравнению с вариантом с DMSO

рольному уровню [54,55]. Следовательно, физиологическое состояние клеточных культур действительно может зависеть от длительности культивирования после декриоконсервации. Культуры фибробластов кожи индийского мунджака отличаются от других способностью переживать криоконсервацию без криопротекторов (выживаемость 15%). Исследование таких культур позволяет выяснить, как криоконсервация влияет на цитогенетические параметры, в чем возможные причины нежизнеспособности большинства клеточных линий при криоконсервации без криопротекторов, какова роль DMSO в изменении исследуемых цитогенетических характеристик. Нами проведено исследование влияния криоконсервации в присутствии 10% DMSO и без него на выживаемость, внеплановый синтез ДНК, количество и типы хромосомных aberrаций. Исследовано также влияние DMSO на хро-

и с интактным контролем ( $16.0 \pm 2.0$ ,  $2.3 \pm 0.8$ ,  $0.9 \pm 0.5\%$ , соответственно); через 7 сут наблюдается нормализация исследуемого параметра. При хранении клеток в течение 6 мес количество aberrаций значительно выше ( $88.5 \pm 2.4\%$ ), чем при хранении в течение 7 сут ( $24.0 \pm 2.4\%$ ). Показано, что в хромосоме X длительная криоконсервация без DMSO способствует увеличению числа точек, подверженных разрывам, по сравнению с кратковременной криоконсервацией. Помимо значительного увеличения хромосомных разрывов, наблюдается достоверное увеличение дицентриков по сравнению с контролем ( $11.4 \pm 2.0$ ,  $0.4 \pm 0.4\%$ , соответственно). Возможно, что при длительном хранении клеток в условиях криоконсервации накапливается большое количество потенциальных хромосомных повреждений, которые в отсутствие DMSO реализуются в истинные перестройки. Наблюдаемое явление сходно с известным феноменом увеличения частоты мутаций при длительном хранении семян, установленным М. С. Навашиным [56]. По-видимому, DMSO способствует репарации потенциальных хромосомных повреждений. Имеет место неслучайное вовлечение хромосом в образование дицентриков в клетках, криоконсервированных без DMSO в течение 6 мес. Так, из 30 проанализированных дицентриков 23 (75%) имеют в своем составе хромосомы 1, 2, X и сочетания 1+X; 2+X.

В клетках, обработанных 10% DMSO в течение 2 ч (без криоконсервации), наблюдается достоверное снижение выживаемости клеток ( $93.0 \pm 2.0\%$ ) по сравнению с контролем ( $99.0 \pm 1.0\%$ ). Обнаружено существенное увеличение количества хромосомных aberrаций за счет хромосомных, хроматидных разрывов и транслокаций. Следовательно, DMSO в зависимости от условий взаимодействия с клетками может обладать цитотоксичным и генотоксичным действием, что подтверждает данные более ранних исследований [57-60].

**2.1.3. Влияние сыворотки на хромосомные aberrации в клеточных линиях М и М<sub>1</sub>.** Не имея возможности полностью проконтролировать состав сыворотки или совсем исключить ее из компонентов ростовой среды, мы провели исследование влияния эмбриональной бычьей сыворотки разных серий в концентрациях 10 и 3% на изменчивость хромосом (Полянская и др., 1993). Обобщенные результаты представлены на рис. 46 и 56.

Из полученных данных следует, что при культивировании клеток линии М в среде с 10% сыворотки серий 181 и 33 в течение 120 и 135 сут не изменяется количество хромосомных повреждений; тем не менее, среднее количество aberrаций достоверно различается:  $12.0 \pm 1.0\%$  (сер. 181) и  $5.4 \pm 1.3\%$  (сер. 33) -  $P < 0.01$ . По-видимому, качество сыворотки отражается на спонтанном уровне хромосомных aberrаций.

Проведено сравнение влияния сыворотки в концентрации 3 и 10% на кариотипическую изменчивость. При культивировании клеток М в среде с 3% сыворотки серии 181 в течение 30 сут значительно увеличилось количество хромосомных aberrаций за счет хромосомных разрывов и дицентриков; через 60 сут наблюдаемое увеличение хромосомных aberrаций происходило только за счет дицентриков ( $P < 0.05$ ), количество которых через 90 сут снизилось до контрольного уровня.

При использовании 3% сыворотки серии 33 в процессе культивирования клеток М уже через 15 сут отмечалось существенное увеличение количества

аббераций за счет хромосомных, хроматидных разрывов и дицентриков по сравнению с контролем (10%).

Следовательно, снижение оптимальной концентрации сыворотки, несмотря на введение добавок, приводит к усилению хромосомной нестабильности, но характер этой нестабильности зависит от качества сыворотки.

При культивировании другой сублинии клеток -  $M_1$  в среде с 10% сыворотки серии 33 в течение 120 сут количество хромосомных аббераций не меняется, но оно выше, чем в линии  $M$  в варианте с этой же серией. Так, в среднем, в линии  $M$  количество аббераций -  $5,4 \pm 1,3\%$ , а в  $M_1$  -  $11,7 \pm 1,5\%$  ( $P < 0,01$ ). При культивировании клеток  $M_1$  в среде с 3% сыворотки количество аббераций изменялось иным образом по сравнению с клетками  $M$  в тех же условиях: в течение 60 сут наблюдалось постепенное увеличение только количества дицентриков, которое к 90-м сут снизилось до контрольного уровня. По-видимому, характер кариотипической изменчивости при одинаковых условиях культивирования может зависеть от конкретной структуры кариотипа клеточной популяции.

В клетках  $M$  в среде со сниженной концентрацией сыворотки при анализе 64 дицентриков показано неслучайное вовлечение хромосом в их образование - в 80% обнаружена хромосома 1; в 61% - хромосома 2 и в 20% - X.

**2.1.4. Исследование кариотипической изменчивости в процессе длительного культивирования в клеточной сублинии NBL-3-17.** Очевидно, что сам фактор времени при длительном культивировании может вызывать кариотипическую нестабильность, т.к. при культивировании всегда имеется совокупность условий, которые невозможно учесть (качество сыворотки, культуральной посуды, небольшие колебания температуры и т.д.) Поэтому длительное культивирование в одинаковых или постоянных условиях - понятие относительное. Полученные результаты подтверждают эту точку зрения. В двух независимых опытах показано, что культивирование клеток сублинии NBL-3-17 в течение 30-150 сут приводит к существенному увеличению количества хромосомных аббераций, в основном за счет дицентриков (рис. 4д и 5д). Так, в первом опыте наблюдаемое количество дицентриков через 30 сут составляло  $1,9 \pm 1,3\%$ , а через 150 сут -  $10,0 \pm 3,0\%$ ; во втором опыте наблюдаемое количество дицентриков через 40 сут составляло  $3,3 \pm 1,4\%$ , через 110 сут -  $20,0 \pm 4,0\%$ . Разные хромосомы с разной вероятностью участвуют в образовании дицентриков. Наиболее часто вовлекаются хромосомы 1, 4 и X (с частотой 44%, каждая); хромосома 1 соединяется преимущественно q-плечом, хромосома X - равномерно двумя плечами (Полянская, Ефремова, 1996).

Таким образом, совокупность представленных в этом разделе данных позволяет с большой вероятностью утверждать, что дицентрики, которые появляются под влиянием факторов, как правило присутствующих при длительном культивировании, являются характерной чертой кариотипической изменчивости в клеточных линиях без маркерных хромосом.

**2.2. Действие факторов, влияющих на жизнедеятельность клеток, на структурную кариотипическую изменчивость в разных клеточных линиях при длительном культивировании**

**2.2.1. Изменчивость хромосом мунтжака в гибридах соматических клеток.** Исследовали изменчивость хромосом фибробластов кожи индийского



мунтжака в гибридах соматических клеток между клетками JF1, и клетками M1 и M2 (Полянская, Фридлянская, 1991). Из полученных результатов следует, что в гибридных клетках (M1xJF1 и M2xJF1) количество хромосомных aberrаций достоверно выше через 27 и 34 сут культивирования, чем в клетках M1 и M2, в основном за счет увеличения хромосомных разрывов и дицентриков (рис. 4в и 5в). По мере культивирования количество хромосомных aberrаций постепенно снижается и через 128 сут не отличается от количества aberrаций, характерного для родительских клеток мунтжака. Позднее другими авторами было показано увеличение количества теломерных ассоциаций в клеточных гибридах между клетками SVM, трансформированными вирусом SV40, и спонтанно трансформированными фибробластами кожи индийского мунтжака [61].

При анализе 123 дицентриков обнаружено неслучайное вовлечение хромосом в их образование: в 68% обнаружена хромосома 1; в 61% - хромосома 2; в 17% -  $Y_2$ ; в 13% - X. Следовательно, дицентрики образуются преимущественно за счет хромосом 1 и 2. Наблюдаются неслучайные сочетания хромосом при образовании дицентриков. Наиболее часто встречались сочетания хромосом: 1+1 (22.4%), 1+2 (25%); несколько реже - 1+X (14.5%), 2+2 (14.5%) и 2+ $Y_2$  (11.8%). Остальные 5 возможных сочетаний наблюдались с частотой не более 5%. Участие хромосомных плеч при слиянии теломер не всегда равномерно: хромосома 1 равномерно соединялась как p-, так и q-плечами, а хромосома 2 преимущественно q-плечом. В клеточных гибридах в "крысиной" части кариотипа дицентрики не наблюдались.

Анализ частоты хромосомных разрывов показал, что наиболее ломкими являются хромосомы 1 ( $77.3 \pm 3.4\%$ ) и X ( $20.0 \pm 3.3\%$ ). С помощью критерия  $\chi^2$  показано, что наблюдаемое распределение хромосомных разрывов не зависит от относительной длины и количества исследованных хромосом ( $P < 0.01$ ). Существенно, что в хромосоме 2, которая с высокой частотой участвует в образовании дицентриков, хромосомные разрывы регистрируются сравнительно редко. Эти данные могут косвенно свидетельствовать о том, что основная масса дицентриков действительно образована посредством слияния теломер, а не с помощью разрывов. Из полученных результатов следует, что причиной хромосомного дисбаланса в гибридных клетках является изменение генотипической среды после гибридизации, т.к. изменчивость хромосом мунтжака в родительских и гибридных клетках в идентичных условиях культивирования, выявляемая на одних и тех же препаратах, различается.

**2.2.2. Влияние микоплазменной контаминации разных клеточных линий на хромосомные aberrации.** Учитывая существенное влияние микоплазм на жизнедеятельность клеток [62-65], нами было проведено сравнительное исследование влияния длительной микоплазменной контаминации на количество хромосомных aberrаций в "безмаркерных" и "маркерных" клеточных линиях.

**1) Клеточная линия М.** Результаты, полученные при длительной искусственной контаминации клеток линии М двумя видами микоплазм (*Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma arginini*), имеющими разные биохимические пути взаимодействия с клетками [64], свидетельствуют о существенном влиянии обеих микоплазм на кариотипическую изменчивость (Полян-

кая, Ефремова, 1992, 1994). При контаминации *M. arginini* в течение 95 - 150 сут наблюдается достоверное увеличение хромосомных aberrаций только за счет дицентриков; другие типы aberrаций достоверно не превышают уровень контроля (рис. 4e<sub>1</sub>, 5e<sub>1</sub> и 8). При контаминации *A. laidlawii* в течение 95 - 168 сут также преимущественным типом хромосомных изменений являются дицентрики ((рис. 4e<sub>2</sub>, 5e<sub>2</sub> и 9). При контаминации обоими видами микоплазм преимущественно участвуют в образовании дицентриков хромосомы 1, 2, реже X. С помощью критерия  $\chi^2$  показано, что имеет место действительно неслучайное вовлечение определенных хромосом в образование дицентриков, несмотря на разное количество гомологичных хромосом в основном СВК 2+2+1+1+1 ( $P < 0.01$ ). Преимущественными сочетаниями хромосом в дицентриках при контаминации *M. arginini* и *A. laidlawii* являются 1+2 (46 и 45%) и 1+X ((17 и 15%), соответственно. Хромосома 2 соединяется преимущественно q-плечом, а хромосома X - p-плечом.

Для деконтаминации клеточной культуры был применен ЦФ в дозе 10 мкг/мл (Полянская, Ефремова, 1993, 1994; Полянская и др., 1994а, б.; Freedlanskaya et al., 1994). Культивирование с ним клеток в течение 15 - 45 сут привело к снижению количества дицентриков до контрольного уровня, который сохранялся и при последующем культивировании клеток на чистой среде в течение 30 - 45 сут.

**2) Клеточная линия NBL-3-17.** Из полученных результатов следует (рис. 4e<sub>2</sub>, 5e<sub>2</sub>), что при контаминации клеток сублинии NBL-3-17 *A. laidlawii* в течение 40 сут наблюдается достоверное увеличение количества хромосомных aberrаций, за счет достоверного увеличения дицентриков (в 3.5 раза) и менее значительного увеличения хромосомных разрывов (в 1.7 раза,  $P < 0.05$ ). Через 110 сут культивирования действие микоплазменной контаминации на эти клетки обнаружить нельзя, т.к. согласно результатам, полученным в неконтаминированном варианте, происходит суммирование двух воздействий: фактора времени и контаминации. Поэтому наблюдаемое появление в контаминированном варианте дицентриков, возможно, частично связано с фактором времени при длительном культивировании (Полянская, Ефремова, 1996). Показано, что в контаминированных клетках разные хромосомы с разной вероятностью участвуют в образовании дицентриков: наиболее часто в этом процессе участвуют хромосомы 1 - q-плечо (51%), 2 (42%) и 4 (36%); реже - хромосомы 3 (22%), X (19%) и 5 (6.5%).

Анализ хромосомных aberrаций показал, что разрывы распределяются по хромосомам неравномерно. Наиболее часто как в чистой, так и в контаминированной культурах разрывы встречаются в хромосомах 1, 2 и X. Следует отметить, что хромосома 4, активно участвующая в образовании дицентриков, крайне редко подвергается разрывам. Подобное явление отмечалось ранее для хромосомы 2 фибробластов кожи индийского мунтжака (Полянская, Фридлянская, 1991). Оба явления могут быть косвенным свидетельством того, что основная масса дицентриков действительно образована посредством слияния теломер, а не с помощью разрывов.

**3) Клеточная линия SK-UT-1B.** При контаминации клеток *A. laidlawii* в течение 30 - 90 сут происходит постепенное увеличение количества дицентриков, которое к 90-м сут достигает величины в 13 раз большей, чем в контроле; тогда как количество хроматидных разрывов увеличивается только в

2 раза (рис. 4е<sub>2</sub>, 5е<sub>2</sub> и 10). Существенно подчеркнуть, что дицентрики появляются независимо от других типов хромосомных aberrаций и увеличиваются в количестве по мере удлинения срока контаминации (Полянская и др., 1998).

**4) Клеточная линия MRC-5.** Ранее нами были исследованы “безмаркерные” постоянные клеточные линии, различающиеся по степени трансформированности. Во всех случаях был получен однозначный результат, свидетельствующий о появлении дицентриков на основе теломерных ассоциаций при разных воздействиях в условиях длительного культивирования. Представляется существенным дополнить эти сведения исследованием неиммortalизованной клеточной линии с ограниченным сроком жизни (Полянская и др., 2000а). При микоплазменной контаминации *A. laidlawii* в течение 15 - 45 сут имеет место постепенное увеличение количества дицентриков. Через 45 сут их наблюдается в 2 раза больше, чем через 15 сут. Количество других типов хромосомных aberrаций соответствует контролю (рис. 4е<sub>2</sub>, 5е<sub>2</sub>). Следовательно, полученные результаты подтверждают выдвинутое ранее предположение о том, что дицентрики, образованные на основе теломерных ассоциаций, являются характерной чертой кариотипической изменчивости в “безмаркерных” клеточных линиях в условиях длительного культивирования при разных воздействиях, независимо от степени трансформированности этих линий.

**5) Клеточные линии V-79 и M HeLa clone 11.** Для подтверждения выдвинутого нами положения о дицентриках (теломерных ассоциациях) как характерной черте кариотипической изменчивости в “безмаркерных” клеточных линиях необходимо было провести исследование данного параметра в линиях с маркерными хромосомами при индуцирующих хромосомную нестабильность воздействиях в условиях длительного культивирования (Полянская, Ефремова, 1993; Полянская и др., 1994а, б; Freedlanskaya et al., 1994; Полянская и др., 1996; Полянская, Ефремова, 2000). Показано, что при контаминации клеток линии V-79 в течение 30 - 70 сут (*A. laidlawii*) и в течение 53 - 131 сут (*M. arginini*) количество хромосомных aberrаций существенно увеличивалось, но только за счет хромосомных и хроматидных разрывов. При контаминации клеток линии M HeLa clone 11 в течение 15 - 60 сут (*A. laidlawii*) и в течение 30 сут (*M. arginini*) генотоксический эффект не был обнаружен (рис. 6). Известны и другие данные об отсутствии генотоксического влияния микоплазменной контаминации ([66]; Полянская, Смирнова, 1987). Генотоксическое влияние выявляется только при удачном сочетании чувствительности клеточной линии, вида и количества микоплазмы, а также оптимальной длительности воздействия.

**2.2.3. Влияние ципрофлоксацина на хромосомные aberrации в клеточных линиях NBL-3-11 и M.** В этом разделе приведены результаты по исследованию влияния на кариотипическую изменчивость “безмаркерных” клеточных линий ЦФ - фактора, дестабилизирующего клеточные процессы (Полянская, Сизова, 1996). В высоких концентрациях ЦФ индуцирует хромосомные нарушения в клетках костного мозга мыши [67]. Механизм действия ЦФ как аналога 4-хинолина заключается, по-видимому, в ингибировании топоизомеразы II, которая участвует во многих клеточных процессах [68-73]. Генотоксическое влияние его на культивируемые клетки при разных кон-

центрация и длительность действия ранее не изучалось.

Показано, что при кратковременном действии ЦФ на клетки М только в концентрации 50 мкг/мл наблюдается генотоксическое влияние; концентрации 10 и 25 мкг/мл - негенотоксичны, а концентрация антибиотика 100 мкг/мл, за исключением 6-часового воздействия, - летальна для клеток. При разной длительности действия ЦФ в указанных пределах возрастало количество хромосомных aberrаций разного типа. При кратковременном действии ЦФ на клетки NBL-3-11 в концентрациях 25, 50 и 100 мкг/мл также наблюдается генотоксический эффект и возрастание количества хромосомных aberrаций разного типа при разной длительности действия ЦФ в указанных пределах. Различие типов aberrаций хромосом, возникающих в клетках обеих исследуемых линий при разной длительности кратковременного действия ЦФ в эффективных концентрациях, по-видимому, объясняется его действием на клетки в разных фазах митотического цикла. В обеих линиях не обнаружено увеличение количества дицентриков.

При длительном действии ЦФ (15 сут) на клетки М наблюдается генотоксическое влияние в концентрациях 25 и 50 мкг/мл, причем в первом случае только за счет дицентриков, а во втором - за счет хромосомных разрывов и дицентриков; через 30 сут генотоксическое влияние при концентрации 25 мкг/мл исчезает, т. е. количество дицентриков возвращается к контрольному уровню; а при 50 мкг/мл генотоксический эффект имеет место за счет всех типов хромосомных aberrаций, включая дицентрики (рис. 4г и 5г). При анализе 88 дицентриков установлено неслучайное вовлечение хромосом в их образование: хромосома 1 (48%), 2 (20%) и  $Y_1$  (16%), X (11%) и  $Y_2$  (8%); наиболее часто встречаются сочетания 1+1(24.4%), 1+ $Y_1$ (24.4%), 1+2 (9.7%), 1+X (9.0%), и 2+ $Y_1$ (6.7%). Остальные сочетания хромосом наблюдаются с частотой 0.5% каждое. Эти результаты в большой степени сходны с полученными при действии антибиотиков в "терапевтических" дозах: в обоих случаях обнаружено заметное участие в образовании дицентриков хромосомы  $Y_1$  и сочетания 1+ $Y_1$  (Полянская, 1989). Возможно, что этот факт свидетельствует о специфическом действии антибиотиков именно на эту хромосому, т. к. другие хромосомы участвуют в образовании дицентриков и при других воздействиях.

Полученные результаты являются дополнительным доказательством того, что дицентрики представляют собой характерную черту кариотипической изменчивости в "безмаркерных" клеточных линиях при длительном культивировании.

**2.2.4. Влияние внеклеточного белка теплового шока (в-БТШ70) на хромосомную изменчивость в клеточной линии М.** Проведенное исследование охватывает только кратковременное воздействие в-БТШ70 на культивируемые клетки. Известна защитная функция белков теплового шока, в частности в-БТШ70, для разных клеток [74-77]. Данные о роли в-БТШ70, как фактора защиты, на уровне хромосом нам неизвестны. Было исследовано влияние в-БТШ70 на хромосомную нестабильность, индуцированную ЦФ (Полянская и др., 1997). Из результатов, представленных в табл. 1, следует, что ЦФ и в-БТШ70 (50, 100 мкг/мл, соответственно) при раздельном действии на интактные клетки в течение 6 и 24 ч вызывают достоверное увеличение количества хромосомных aberrаций по сравнению с контролем за счет хро-

матидных или хромосомных разрывов. При совместном действии ЦФ и в-БТШ70 в течение 6 и 24 ч наблюдается достоверное снижение хромосомных aberrаций до уровня контроля. Различие в типах aberrаций хромосом, обнаруженное при разной длительности действия ЦФ и в-БТШ70, объясняется, по-видимому, действием агентов на клетки в разных фазах митотического цикла.

Таблица 1

**Влияние внеклеточного белка теплового шока (в-БТШ70) на количество хромосомных aberrаций в интактных и обработанных ципрофлоксацином (ЦФ) клетках линии М при разных условиях воздействия**

Вариант опыта	Концентрация агента, мкг/мл	Длительность действия до фиксации, ч	Число проанализированных клеток	Частота клеток с хромосомными aberrациями, $x \pm s_x, \%$	Частота хромосомных aberrаций разного типа, $x \pm s_x, \%$					
					всех aberrаций	хромосомных разрывов	хроматидных разрывов	дигентриков без двойных фрагментов	aberrаций обменного типа	Частота хромосомных и хроматидных пробелов, $x \pm s_x, \%$
Контроль		24	250	8.4±1.8	8.4±1.8	3.2±1.1	2.8±1.0	2.4±1.0	0.0±0.4	0.4±0.4
ЦФ	50	24	245	18.8±2.5 <sup>1</sup>	23.3±2.7 <sup>1</sup>	11.8±2.1 <sup>1</sup>	5.7±1.5	4.1±1.3	1.6±0.8	1.2±0.7
ЦФ+ в-БТШ70	50+10	24	105	19.0±3.8 <sup>1</sup>	26.7±4.3 <sup>1</sup>	12.4±3.2 <sup>1</sup>	7.6±2.5	4.8±2.1	1.9±1.3	3.8±1.9
	50+100		205	10.2±2.1	11.7±2.2	7.3±1.8	2.9±1.2	1.0±0.7	0.5±0.5	3.9±1.4
в-БТШ70	10	24	130	12.3±2.9	12.3±2.9	8.5±2.4	3.8±1.7	0.0±0.8	0.0±0.8	5.3±2.0
	100		270	18.5±2.3 <sup>1</sup>	20.4±2.4 <sup>1</sup>	11.5±1.9 <sup>1</sup>	3.3±1.1	4.1±1.2	1.5±0.7	3.0±1.0
Контроль		6	250	9.2±1.8	10.0±1.9	4.0±1.2	2.4±1.0	3.6±1.2	0.0±0.4	0.8±0.6
ЦФ	50	6	145	24.1±5.5 <sup>1</sup>	26.9±3.7 <sup>1</sup>	6.9±2.1	13.1±2.8 <sup>1</sup>	3.4±1.5	3.4±1.5	4.8±1.8
ЦФ+в-БТШ70	50+100	6	130	12.3±2.9	13.1±3.0	5.4±2.0	6.9±2.2	0.8±0.8	0.0±0.8	3.0±1.5
в-БТШ70	100	6	130	20.8±5.5 <sup>1</sup>	27.3±4.2 <sup>1</sup>	9.1±2.7	16.4±3.5 <sup>1</sup>	0.9±0.9	0.9±0.9	4.5±2.0
Контроль			560	9.8±1.2	11.2±1.4	5.0±0.9	2.8±0.7	3.0±0.7	0.4±0.3	2.0±0.6
ЦФ	50	24	540	20.2±1.7 <sup>1</sup>	24.2±1.8 <sup>1</sup>	14.1±1.5 <sup>1</sup>	5.0±0.9	4.1±0.8	1.1±0.4	1.3±0.5
ЦФ+ в-БТШ70	50+100	24+6 <sup>a</sup>	115	11.3±3.0	12.2±3.1	4.3±1.9	2.6±1.5	2.6±1.5	2.6±1.5	4.3±1.9
в-БТШ70	100	6	130	20.8±3.5 <sup>1</sup>	29.2±4.0 <sup>1</sup>	10.0±2.6	16.2±3.2 <sup>1</sup>	2.3±1.3	0.9±0.9	3.8±1.7
ЦФ	50	6+18 <sup>b</sup>	325	24.0±2.4 <sup>1</sup>	31.0±2.5 <sup>1</sup>	14.8±2.0 <sup>1</sup>	7.1±1.4 <sup>1</sup>	7.2±1.4 <sup>1</sup>	2.1±0.8	2.1±0.8
ЦФ+ в-БТШ70	50+100	6+18 <sup>a</sup>	435	18.8±1.9 <sup>1</sup>	20.9±1.9 <sup>1</sup>	12.2±1.6 <sup>1</sup>	6.2±1.2	1.8±0.6	0.7±0.4	6.0±1.1
в-БТШ70	100	6+18 <sup>a</sup>	270	25.2±4.3 <sup>1</sup>	33.0±2.8 <sup>1</sup>	14.4±2.1	8.6±1.7 <sup>1</sup>	7.8±1.6 <sup>1</sup>	2.2±0.9	4.8±1.3

<sup>1</sup>-достоверно отличается от соответствующего контроля ( $P < 0.01$ )

<sup>a</sup>-введение ЦФ за 24 ч до фиксации, за 6 ч до фиксации добавлен в-БТШ70.

<sup>b</sup>- введение агента на 6 ч с последующим культивированием 18 ч на чистой среде до фиксации.

<sup>a</sup>-введение ЦФ и в-БТШ70 одновременно на 6 ч с последующим культивированием 18 ч на чистой среде до фиксации

С целью выяснения причин генотоксичности в-БТШ70 было исследовано влияние денатурированного белка на хромосомную изменчивость. Полученные данные свидетельствуют о том, что защитный эффект в-БТШ70 сохраняется до тех пор, пока не нарушена его нативная конформация.

Важно было выяснить, зависит ли характер защитного действия в-БТШ70 на хромосомы от фазы митотического цикла. Частично ответ на этот вопрос дают результаты, представленные на этой же таблице. Показано, что при введении в-БТШ70 за 6 ч до фиксации в обработанную ЦФ в течение 24

ч культуру имеет место достоверное снижение количества хромосомных aberrаций по сравнению с их отдельным действием до уровня контроля. Введение же в-БТШ70 одновременно с ЦФ на 6 ч с последующим культивированием в течение 18 ч на чистой среде до фиксации вызывает неоднозначный эффект. А именно, при одновременном введении ЦФ и в-БТШ70 на 6 ч и последующем культивировании на чистой среде в течение 18 ч до фиксации не наблюдается достоверного уменьшения частоты клеток с хромосомными aberrациями по сравнению с отдельным действием агентов, но по количеству всех aberrаций имеют место достоверные различия как при сравнении с контролем, так и с отдельным действием агентов, т.е. имеет место небольшой защитный эффект, причем исключительно за счет уменьшения количества дицентриков. В данном случае действие агентов осуществляется, по-видимому, в поздней G1 - ранней фазе S. Эти данные свидетельствуют о том, что дицентрики, характерные для "безмаркерных" линий при разных воздействиях в условиях длительного культивирования могут появляться и при некоторых кратковременных воздействиях. Обращает внимание факт исчезновения дицентриков при совместном действии ЦФ и в-БТШ70, тогда как хромосомные разрывы не подвергаются модификации, что, возможно, связано с разным значением этих хромосомных нарушений для клетки. Из совокупности представленных результатов следует, что защитное действие на хромосомы в-БТШ70 оказывает в большей степени в фазе G2 митотического цикла. Возможно, что в-БТШ70 защищает топоизомеразу II - фермент, который принимает участие в репарации ДНК и в то же время является мишенью для ЦФ [67,80,81]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при действии в-БТШ70 на интактные клетки всегда наблюдается генотоксический эффект. В литературе также имеются данные, когда один и тот же агент, в том числе и БТШ70, оказывает мутагенное или антимутагенное действие в зависимости от условий [77-79].

**Характерные черты дицентриков, возникающих в "безмаркерных" клеточных линиях в процессе культивирования в разных условиях**

Нам удалось показать, что характерной чертой кариотипической изменчивости в "безмаркерных" клеточных линиях при длительном культивировании в разных условиях являются дицентрики, образованные на основе теломерных ассоциаций. Установлено несколько характерных черт дицентриков (Полянская, 2000; Полянская и др., 2000б).

1. Постоянное появление дицентриков с определенной частотой, преимущественно при длительном воздействии разных по своим свойствам факторов в процессе культивирования "безмаркерных" клеточных линий (рис. 4, 5). Наблюдается разная степень увеличения количества дицентриков: их число может превышать уровень всех остальных хромосомных aberrаций, может соответствовать этому уровню или быть несколько ниже. Из данных рис. 6 следует, что при микоплазменной контаминации "маркерных" клеточных линий количество дицентриков не увеличивается по сравнению с интактным контролем. Хромосомная изменчивость в этих линиях имеет иной характер по сравнению с "безмаркерными".

2. Отсутствие постоянной взаимосвязи с другими типами хромосомных нарушений и наличие определенной количественной динамики дицентриков (рис. 7-10). Как видно из приведенных примеров, постоянный повышен-

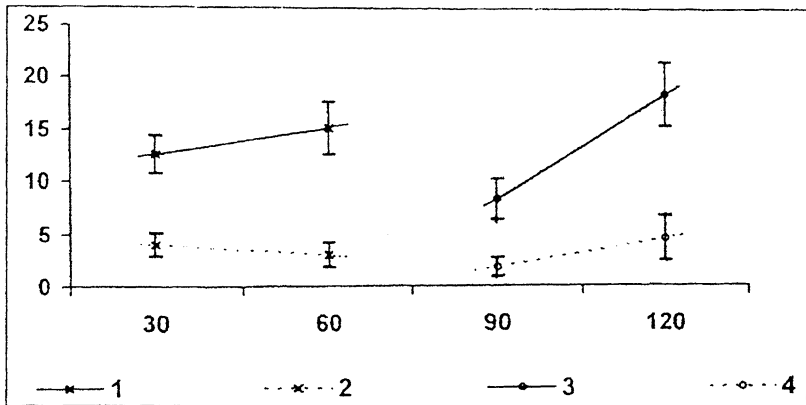


Рис. 7. Зависимость количества дицентриков и остальных типов хромосомных aberrаций в клетках линии М и сублинии МТ от длительности культивирования с «терапевтическими» дозами антибиотиков.

По оси абсцисс: длительность культивирования, сут; по оси ординат: частота встречаемости хромосомных aberrаций, %.

1 - количество дицентриков при введении антибиотиков сразу после декриоконсервации (М); 2 - количество остальных типов хромосомных aberrаций при введении антибиотиков через 60 сут после декриоконсервации (М); 3 - количество дицентриков при введении антибиотиков через 60 сут после декриоконсервации (МТ); 4 - количество остальных типов хромосомных aberrаций при введении антибиотиков через 60 сут после декриоконсервации (МТ).

ный уровень количества дицентриков не влечет за собой повышение уровня других хромосомных aberrаций, что может свидетельствовать об отсутствии нарушений при прохождении анафазы этими структурами, т.е. о нормальной сегрегации хромосом в митозе.

### 3. Преимущественное участие определенных хромосом в образовании ди-

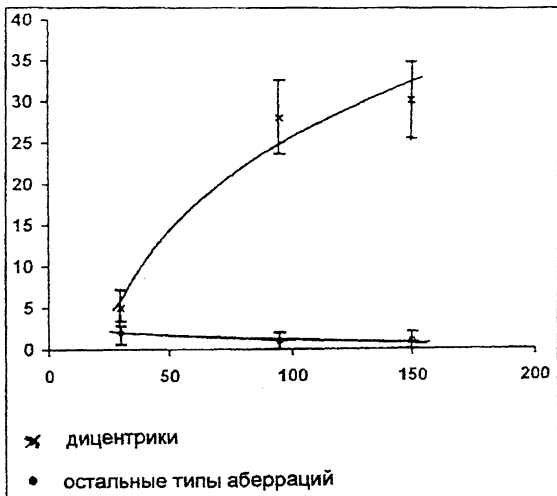


Рис. 8. Зависимость количества дицентриков и остальных типов хромосомных aberrаций в клетках линии М от культивирования с *M. arginini*.

По оси абсцисс: длительность культивирования, сут; по оси ординат: частота встречаемости хромосомных aberrаций, %.

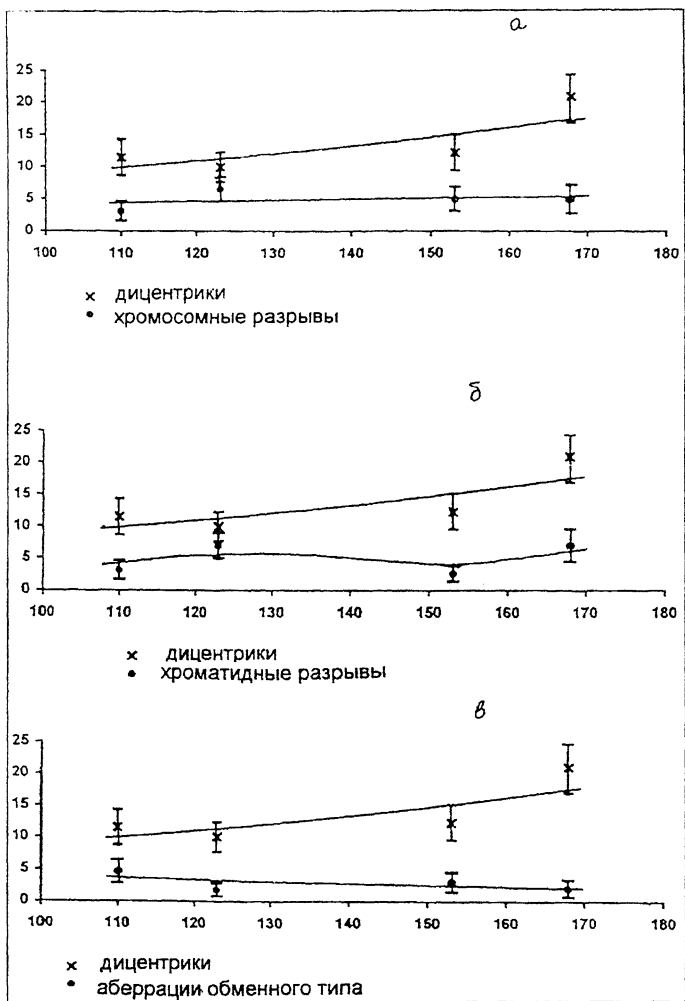


Рис. 9. Зависимость количества дицентриков и хромосомных разрывов (а), хроматидных разрывов (б), аббераций обменного типа (в) в клетках линии М от культивирования с *A. arginini*.

По оси абсцисс: длительность культивирования, сут; по оси ординат: частота встречаемости хромосомных аббераций, %.

**дицентриков.** При исследовании влияния разных воздействий на клетки линий фибробластов кожи индийского мунтжака показано, что хромосомы 1, 2 (реже X) преимущественно участвуют в образовании дицентриков; часто встречающиеся сочетания 1+2 и 1+X с преимущественным участием q-плеча хромосомы 2. Для линии NBL-3-17 преимущественно участвуют в этом процессе хромосомы 1(q-плечо) и 4.



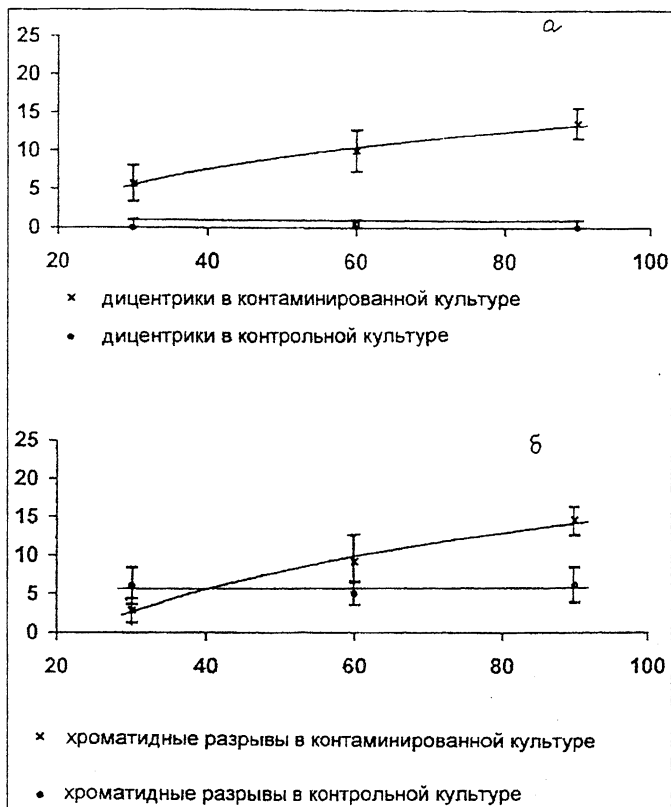


Рис. 10. Зависимость количества дицентриков (а) и хроматидных разрывов (б) в контаминированных *A. arginini* и контрольных клетках линии SK-UT-1В от длительности культивирования.

По оси абсцисс: длительность культивирования, сут; по оси ординат: частота встречаемости хромосомных aberrаций, %.

Учитывая перечисленные свойства дицентриков, можно заключить, что образование дицентриков в "безмаркерных" клеточных линиях носит универсальный характер. Возможно, что роль дицентриков в данном случае состоит не в создании кариотипической нестабильности, а наоборот, в образовании генетических структур, обеспечивающих систему адаптации клеточной популяции к неблагоприятным факторам. Возможно, что образование дицентриков стабилизирует теломерную ДНК [82].

Указанные выше свойства дицентриков позволяют предположить их постоянное существование на некотором отрезке времени, что возможно при инактивации одного из центромер [83-87]. В этом случае в процессе длительного культивирования возможно участие отбора в стабилизации определенных дицентриков. Можно рассмотреть три положения в поддержку этой точки зрения. 1) В наших экспериментах показано, что способность образо-

вызвать дицентрики свойственна всем хромосомам в любых сочетаниях, и следовательно, должен существовать механизм, обеспечивающий реально наблюдаемые разные количественные соотношения между дицентриками. 2) Имеют место различия между преимущественным участием определенных хромосом в образовании дицентриков при кратковременном воздействии (Полянская и др., 1997) и при разных длительных воздействиях. 3) Известно, что наиболее устойчивыми являются варианты дицентриков с короткими расстояниями между центромерами [88]. В наших же экспериментах, наоборот, преимущество при образовании дицентриков имеют длинные хромосомы. Можно провести аналогию между частотами встречаемости дицентриков и нестабильных маркеров, часто наблюдаемых в "маркерных" клеточных популяциях. Генетическое значение, которое имеют маркеры и дицентрики в клеточных популяциях, вероятно, сходно. В обоих случаях, видимо, имеет место эффект положения, и следовательно, изменение функционирования некоторых генов. Но возможны различия в степени изменении генной экспрессии. Это может быть связано с тем, что образование маркерных хромосом обусловлено реальными хромосомными разрывами, в результате которых часто возникают перестройки обменного типа, а образование теломерных ассоциаций происходит при слиянии теломер, по-видимому, без участия тех механизмов, которые задействованы при возникновении хромосомных aberrаций [15 -17,89 - 93].

Следует отметить, что дицентрики, образованные на основе теломерных ассоциаций, встречаются и в других клетках, но это достаточно редкое явление. Так, дицентрики наблюдаются в клетках человека, преимущественно в определенных типах опухолей, в нескольких опухолевых клеточных линиях, в стареющих фибробластах, при вирусной трансформации первичных клеток и при некоторых незлокачественных синдромах [17,90,94,95]. Но свойства этих дицентриков неоднозначны в разных случаях. По-видимому, подобно хромосомным перестройкам, их роль может быть различной в разных биологических системах. В наибольшей степени свойства дицентриков, установленные в наших экспериментах, сходны с таковыми дицентриков, наблюдавшихся в фибробластах человека при старении [96].

**Действие факторов, как правило присутствующих при длительном культивировании, и факторов, влияющих на жизнедеятельность клеток, на количественную кариотипическую изменчивость в разных клеточных линиях**

Кроме структурной изменчивости кариотипа, в клеточных популяциях *in vitro* имеет место количественная кариотипическая изменчивость. И если структурная изменчивость хромосом, способствующая образованию маркеров, наблюдается не во всех клеточных линиях, то количественная изменчивость всегда сопровождает образование любой клеточной линии. Поэтому параллельно с изучением структурной изменчивости хромосом, в наших экспериментах анализировался и характер анеуплоидии.

Совокупность полученных нами результатов, а также ряд данных литературы, свидетельствуют о том, что кариотипическая структура клеточных популяций *in vitro*, как правило, имеет несколько характерных черт: 1) клетки с модальным числом хромосом, выраженным в большей или меньшей степени; 2) клетки с другими числами хромосом и, в частности, с субмодаль-

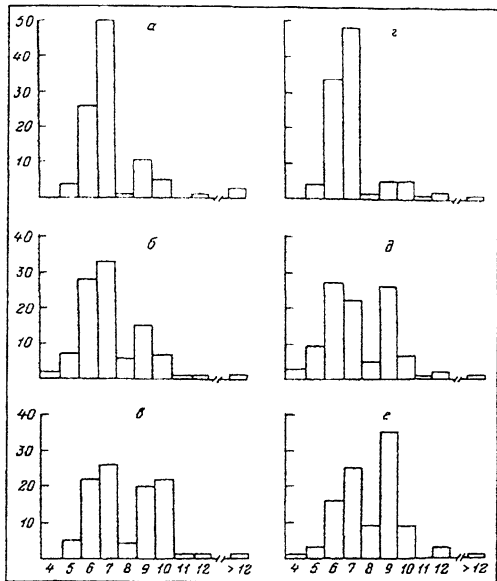


Рис. 11. Распределение по числу хромосом клеток линии М, культивируемых в среде с сывороткой серии 181.

По оси абсцисс: число хромосом в клетке; по оси ординат: частота встречаемости клеток, %.

а-в - культивирование в среде с 10% сыворотки в течение 45, 90 и 120 сут, соответственно; г-е - культивирование в среде с 10% сыворотки в течение 30 сут, а затем в среде с 3% сыворотки в течение 15, 60 и 90 сут, соответственно.

появление новых СВК; 4) изменение пределов изменчивости по числу хромосом. В результате могут образовываться новые устойчивые сублинии, адаптированные к измененным условиям существования клеточной популяции.

Наглядным примером могут служить результаты, представленные на рис. 11, где показано влияние сыворотки на количественную кариотипическую изменчивость клеток М (Полянская и др., 1993). При культивировании клеток с 10% сыворотки серии 181 в течение 45-120 сут имеет место изменение характера распределения клеток по числу хромосом. После 120 сут культивирования частота клеток с модальным числом хромосом достоверно уменьшается, а частота клеток с 9 и 10 хромосомами достоверно увеличивается. Следовательно, имеет место равная частота встречаемости клеток с 6, 7, 9 и 10 хромосомами ( $22.0 \pm 2.9$ ,  $25.0 \pm 3.1$ ,  $20.0 \pm 2.8$  и  $22.0 \pm 2.9\%$ , соответственно). Анализ частоты встречаемости разных СВК показал, что для клеток с модальным числом хромосом характерен основной СВК  $2+2+1+1+1$ ; для клеток с субмодальным числом хромосом характерен СВК  $2+2+1+1$ ; для клеток с 9 хромосомами - СВК  $3+3+2+1$  и для клеток с 10 хромосомами - СВК  $3+4+2+1$ . Эти результаты свидетельствуют о том, что клетки с лю-

ным; 3) постоянные пределы изменчивости по числу хромосом; 4) клетки с любым выраженным числом хромосом имеют преобладающий СВК, который в клетках с модальным числом хромосом называется основным; 5) клетки с любым числом хромосом имеют дополнительные СВК. При варьировании условий длительного культивирования могут происходить изменения в характере анеуплоидии, которые выражаются в следующем: 1) изменение частоты клеток с определенным числом хромосом, включая модальное, при постоянстве среди них количества

клеток с преобладающим или основным СВК; 2) изменение частоты клеток с определенным числом хромосом и одновременное изменение доли клеток с преобладающим или основным СВК среди них; 3)

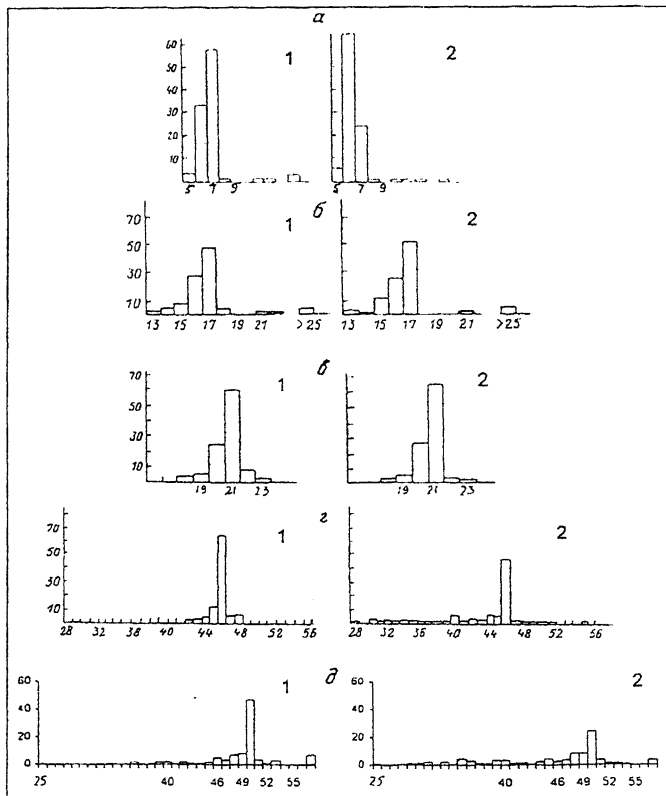


Рис. 12. Распределение по числу хромосом клеток линий М (а), NBL-3-17 (б), V-79 (в), SK-UT-1B (r), M HeLa clone 11 (д) при длительной контаминации *Acholeplasma laidlawii*.

1 - интактный контроль; 2 - контаминированные клетки.

бым числом хромосом, встречающиеся с заметной частотой, всегда имеют преобладающий СВК. Частота СВК в основном не изменяется в процессе культивирования в течение 120 сут. Но есть и исключения: частота СВК 3+4+2+1 увеличивается ( $P < 0.05$ ). Пределы изменчивости по числу хромосом всегда постоянны и составляют 5 -12. Уменьшение содержания сыворотки приводит к перераспределению клеток с разным числом хромосом (рис.11).

Другим примером могут служить результаты, представленные на рис. 12, где показано влияние длительной микоплазменной контаминации *A. laidlawii* на количественную кариотипическую изменчивость в разных клеточных линиях (Полянская, Ефремова, 1993, 1994, 1996, 2000; Полянская и др., 1998). Существенный результат, который следует из этих данных, состоит в том, что в клеточных линиях М, V-79, NBL-3-17 микоплазменная контаминация либо не вызывает изменения в распределении клеток по числу

хромосом, либо вызывает небольшие нарушения, заключающиеся в изменении модального числа хромосом на 1 по сравнению с контролем. Пределы изменчивости по числу хромосом не изменяются. В контаминированных же клетках SK-UT-1B и M HeLa clone 11 существенно изменяется характер распределения клеток по числу хромосом по сравнению с контролем и выше перечисленными линиями. А именно, существенно расширяются пределы изменчивости по числу хромосом по сравнению с контролем (28 - 55 и 40 - 48 хромосом, для SK-UT-1B; 25 - 53 и 35 - 53 хромосомы для M HeLa clone 11). Анализ этих распределений с помощью критерия  $\chi^2$  показал достоверные различия между опытными и контрольными вариантами ( $P < 0.01$ ). Предположительно, наблюдаемые различия связаны с опухолевым происхождением этих линий и возможным наличием у них свойства злокачественности. Так, похожие изменения обнаружены при некоторых воздействиях в других высоко злокачественных линиях [97-100].

При исследовании влияния генотипической среды на характер анеуплоидии в гибридах между клетками JF1 и M2 показано, что через 85 - 128 сут культивирования гибридов, в них устанавливается новая структура кариотипа мунтжака: модальное число хромосом равно 3, основной СВК  $1+2+Y_2$ , пределы изменчивости 1-6 хромосом. Следовательно, изменение генотипической среды приводит к неслучайным количественным нарушениям в кариотипе мунтжака. В связи с этими данными существенно привести результаты, полученные при исследовании двух клеточных гибридов между клетками JF1 и NIH3T3, где показано сходство по ряду признаков клеточной поверхности. Тем не менее, с помощью дифференциальной окраски на С-диски, по-разному проявляющейся на хромосомах мыши и крысы, обнаружены существенные различия между этими гибридами по составу кариотипа: гибрид H9-1 содержит около двух геномов линии крысы и менее 15% генома клеток линии мыши, а гибрид H9-2 содержит по одному геному клеток родительских линий (Фридлянская и др., 1983).

Возможно, что имеются определенные пределы количественной изменчивости в гибридной клеточной популяции. Эти пределы ограничены функциональной активностью генов, ответственных за определенные клеточные свойства, которые селективно выгодны в данной популяции. Это предположение подтверждается как собственными данными, так и литературными [101,102].

Таким образом, образование и дальнейшее существование любой постоянной клеточной линии, по-видимому, связано с установлением баланса между клетками, имеющими разное число хромосом и разные СВК. Поиску количественных закономерностей ограничений кариотипической изменчивости, обуславливающих образование сбалансированной кариотипической структуры, посвящена следующая часть работы (Полянская, 1999; Полянская, Самокиш, 1999 а, б, в, г).

## 2.5. Анализ закономерностей количественной кариотипической изменчивости в разных клеточных линиях

Мы впервые провели статистический анализ отклонений по числу хромосом от их количества в основном СВК и, что особенно важно, исследовали корреляции между разными хромосомами при одновременных, как од-

нонаправленных, так и разнонаправленных отклонениях от основного СВК. Основная часть работы в этом направлении была проведена на "безмаркерных" линиях, которые явились удобной моделью для изучения количественных закономерностей указанных ограничений в связи с их минимальной кариотипической гетерогенностью. Из таких линий были выбраны те, которые имеют малое число крупных, легко идентифицируемых при рутинной окраске хромосом (M, MT и M2 и NBL-3-11). Было проведено сопоставление данных, полученных на "безмаркерных" и "маркерных" линиях с целью возможного обобщения полученных результатов для клеточных линий с разной структурой кариотипа. В качестве "маркерных" линий были исследованы клональные линии яичника китайского хомячка (Полянская и др., 1981).

Установлено, что для выживания клеточной популяции в культуре действительно необходимо существование в ней клеток с конкретными вариантами кариотипов. Закономерности, определяющие кариотипическую структуру, следующие: 1) случайный характер распределения клеток по числу отклонений от основного СВК, 2) специфический характер отклонений каждой хромосомы от основного СВК, 3) наличие связей между отдельными хромосомами при одновременных численных отклонениях.

При анализе совместных отклонений по числу хромосом от основного СВК, в результате которых образовались дополнительные СВК в клетках M, MT и M2, доказано, что существуют достоверные корреляции между хромосомами, т.е. появление этих СВК случайно (табл.2).

*Таблица 2*

**Сравнение наблюдаемого и ожидаемого количества клеток с одновременными численными отклонениями от основного СВК по нескольким хромосомам<sup>1</sup>**

Дополнительные СВК	Наблюдаемое количество сочетаний	Наблюдаемая частота сочетаний	Ожидаемая частота сочетаний	Ожидаемое количество сочетаний	$\chi^2$
3+3+1+2	103	0.04	0.001	2.3	4409
3+3+2+1	21	0.009	0.0008	1.8	2054
3+4+2+1	25	0.011	0.0007	1.6	342
2+2+1+1	510	0.226	0.48	1085	305

<sup>1</sup>-объем выборки 2260 клеток; критическое значение  $\chi^2$  - 11.34

Следовательно, выдвинутое ранее предположение о том, что отбор в клеточной популяции идет не по отдельным хромосомам, а по сбалансированному кариотипу, получило подтверждение. Кариотипическая изменчивость в значительной степени обусловлена взаимодействием хромосом при добавлениях или потерях их по сравнению с основным СВК.

Тем не менее, несмотря на существование общих закономерностей, каждая клеточная линия имеет свои специфические особенности. Так, в каждой линии мунджака наблюдается определенная, отличная от других, частота отклонений по числу хромосом от основного СВК, разная частота отклонений по одинаковым хромосомам (табл. 3), небольшие различия по характе-

ру связей между хромосомами при одновременных численных отклонениях.

Также имеют место различия по характеру связей между отдельными хромосомами при одновременных отклонениях между линией NBL-3-11 и линиями М, МТ и М2. В линии NBL-3-11 эти связи носят либо однонаправленный характер в основном в сторону увеличения числа хромосом, либо разнонаправленный. В линиях мунтжака наблюдается в основном однонаправленный характер численных одновременных отклонений, либо в сторону увеличения, либо - уменьшения по сравнению с основным СВК. Можно предположить, что именно такой характер отклонений в разных клеточных линиях способствует генетической стабильности и селективно выгоден, т.к. эти линии произошли и от разных видов животных и из разных тканей.

*Таблица 3*

**Сравнение тенденций по численным отклонениям хромосом  
в клеточных линиях М, МТ и М2**

<b>Хромосома</b>	<b>М</b>	<b>МТ</b>	<b>М2</b>
1	трисомия	дисомия	дисомия
2	три-тетрасомия	дисомия	ди-трисомия
X	дисомия	нуллисомия	моносомия
Y <sub>2</sub>	дисомия	моносомия	дисомия
Y <sub>1</sub>	нуллисомия	-	-

Известно, что существует функциональная связь между генами, ответственными за геномную стабильность и анеуплоидию, а также локализация функционально связанных генов в разных хромосомах [103-105]. В связи с этим возможно, что стабильность кариотипической структуры клеточной популяции, обеспечиваемая, в частности, характером одновременных численных отклонений хромосом, зависит от взаимодействий на уровне функциональной активности генов. В пользу предположения о регуляции структурно-функциональной организации кариотипа через активность генов, свидетельствуют некоторые экспериментальные результаты, полученные на других моделях. При статистическом анализе корреляций между ЯОР хромосом показан компенсаторный механизм, регулирующий поведение хромосом, несущих ядрышковые организаторы [106,107].

### **3. Заключение**

Нам удалось обнаружить корреляции между статистически выявленными и морфологически выраженными (структурными) закономерностями кариотипической изменчивости. Так, исследование количественной кариотипической изменчивости при индукции хромосомной нестабильности с помощью микоплазменной контаминации и соматической гибридизации клеток (Полянская, Фридлянская, 1991; Poljanskaya et al., 1999; Полянская, Самокиш, 1999 г; Полянская, 2000) показало, что основные закономерности, установленные на интактных культурах, не нарушены. Тем не менее отмечены некоторые изменения в характере отклонений индивидуальных хромосом, а также нарушение некоторых связей между хромосомами. В результате сопоставления количественных и структурных изменений было отмечено: 1) образование дицентриков при микоплазменной контаминации про-

исходит именно теми хромосомами, между которыми нарушены связи при одновременных отклонениях; 2) имеет место связь между неслучайной сегрегацией определенных хромосом мунтжака в клеточном гибриде, JF 1 x M2, и участием несегрегированных хромосом в образовании дицентриков. На основании этих наблюдений выдвинуто предположение, что в "безмаркерных" линиях закономерности количественной изменчивости, установленные при анализе СВК, и тенденции морфологических изменений кариотипа (дицентрики) представляют собой проявления единой клеточно-популяционной функции в различных степенях выражения. При этом появление дицентриков может рассматриваться как одно из проявлений анеуплоидии. В отличие от организма, где существует много способов поддержания устойчивой кариотипической структуры, в условиях *in vitro* основное влияние на эти процессы оказывают непосредственные клеточные контакты и условия культивирования. Поэтому характер структурно-функциональных связей в кариотипе может изменяться, способствуя адаптации клеточной популяции к новым условиям. Приведенные нами результаты позволяют предположить наличие по крайней мере двух способов адаптации клеточных популяций к условиям *in vitro*: 1) образование дицентриков и изменения в регуляции генной активности; 2) стабилизация определенной цитогенетической структуры в популяции (СВК). По-видимому, в клеточной популяции реализуется состояние, которое можно назвать кариотипическим гомеостазом; в целом наблюдаемые явления, морфологически выраженные и статистически выявленные, характеризуют процессы, составляющие такой гомеостаз.

#### 4. Выводы

1. Факторы, как правило присутствующие при длительном культивировании постоянных клеточных линий без маркерных хромосом (фибробласты кожи индийского мунтжака и почка кенгуровой крысы), систематически способствуют образованию дицентриков (теломерных ассоциаций). В этом отношении исследованы: антибиотики в "терапевтических" дозах, длительность хранения без DMSO в жидком азоте, качественно разные сыворотки (в варьирующих концентрациях), продолжительность культивирования. Тот же эффект наблюдается при действии и других факторов, влияющих на жизнедеятельность клеток "безмаркерных" линий (фибробласты кожи индийского мунтжака, почка кенгуровой крысы, лейомиосаркома человека, легкое эмбриона человека) в процессе длительного культивирования. В этом отношении исследованы: изменение генотипической среды в клеточных гибридах, микоплазменная контаминация, антибиотик ципрофлоксацин (ЦФ) в генотоксичных дозах. Из наших и литературных данных следует, что в постоянных клеточных линиях с маркерными хромосомами при длительном культивировании в разных условиях образование дицентриков не наблюдается.

2. Возникающие дицентрики характеризуются: постоянным появлением их с определенной частотой при действии разных по своим свойствам факторов; отсутствием постоянной взаимосвязи с другими типами хромосомных нарушений, наличием определенной количественной динамики при отсутствии усиления хромосомной нестабильности; преимущественным образованием их определенными хромосомами. Совокупность этих свойств по-



звolyет предположить, что появление дицентриков в “безмаркерных” линиях связано с созданием генетических структур, обеспечивающих систему адаптации клеточной популяции как целостного образования к неблагоприятным условиям культивирования.

3. Дицентрики в “безмаркерных” клеточных линиях могут возникать не только при длительных, но и при кратковременных воздействиях в течение одного митотического цикла. Появление дицентриков в этом случае зависит от характера и времени воздействия. В частности, показано, что при раздельном действии ЦФ и внеклеточного белка теплового шока (в-БТШ70) на фибробласты кожи индийского мунтжака предположительно в конце G1 - начале фазы S наблюдаются дицентрики, которые при совместном действии этих факторов не обнаруживаются. По-видимому, в-БТШ70 оказывает защитное действие на индуцированную ЦФ хромосомную нестабильность, которое в наибольшей степени проявляется в фазе G2 митотического цикла.

4. При действии на клетки “безмаркерных” и “маркерных” клеточных линий неопухолевого происхождения (фибробласты кожи индийского мунтжака, почка кенгуровой крысы, легкое эмбриона человека, легкое китайского хомячка, яичник китайского хомячка) антибиотиков в “терапевтических” дозах, ЦФ в генотоксичных дозах, качественно разных культуральных сред и сывороток (в варьирующих концентрациях), при клонировании, а также при микоплазменной контаминации и изменении генотипической среды в условиях длительного культивирования возникают существенно однотипные изменения в количественных характеристиках кариотипа: в соотношении доли клеток с модальным, субмодальным и другими числами хромосом; в соотношении основного и дополнительных структурных вариантов кариотипа (СВК). В клетках с данным числом хромосом выявляется преобладающий СВК, который, возможно, имеет селективное преимущество. Пределы изменчивости по числу хромосом остаются устойчивой характеристикой при любых воздействиях.

5. В клеточных линиях опухолевого происхождения как в “безмаркерной”, так и в “маркерной” (лейомиосаркома человека и карцинома шейки матки человека), в отличие от неопухолевых линий, при длительной микоплазменной контаминации имеет место значительное расширение пределов изменчивости по числу хромосом. Эти результаты в совокупности с данными литературы позволяют предположить, что причиной наблюдаемой нестабильности структуры кариотипа является опухолевое происхождение этих линий, возможно, связанное с наличием свойства злокачественности.

6. Статистический анализ индивидуальных кариотипов, проведенный на большом числе клеток “безмаркерных” и “маркерных” линий (фибробласты кожи индийского мунтжака, почка кенгуровой крысы, яичник китайского хомячка) в отсутствие каких-либо воздействий показал, что для выживания клеточной популяции *in vitro* необходимо существование в ней в определенном соотношении клеток с разными СВК. Выявляются: неслучайный характер распределения клеток по числу хромосомных отклонений от основного СВК; специфический характер отклонений каждой хромосомы от основного СВК; наличие достоверных связей между отдельными хромосомами при одновременных численных отклонениях. Установленные законо-

мерности свидетельствуют о том, что отбор в клеточных популяциях идет не по отдельным хромосомам, а по сбалансированному кариотипу. При микоплазменной контаминации линии фибробластов кожи индийского мунтжака имеют место небольшие изменения в характере отклонений индивидуальных хромосом и частичные нарушения связей между хромосомами при одновременных отклонениях, не изменяющие основные количественные закономерности, установленные для интактных культур.

7. Закономерности количественной изменчивости, установленные при анализе СВК и тенденции морфологических изменений кариотипа (дицентрики), представляют собой проявления единой клеточно-популяционной функции в различных степенях выражения. В пользу этого положения свидетельствуют: образование дицентриков при микоплазменной контаминации именно теми хромосомами, между которыми нарушены связи при одновременных отклонениях; связь между неслучайной сегрегацией определенных хромосом мунтжака в гибриде между клетками клона саркомы Йенсена и фибробластами кожи индийского мунтжака и участием несегрегированных хромосом в образовании дицентриков.

8. Предполагается, что клеточные популяции могут адаптироваться к условиям *in vitro*, по крайней мере, двумя способами: 1) образованием дицентриков и изменениями в регуляции генной экспрессии; 2) стабилизацией определенной цитогенетической структуры в популяции (СВК). Эти способы могут быть как взаимодополняющими, так и взаимозаменяемыми на разных стадиях существования клеточной популяции. В целом в клеточной популяции реализуется состояние, которое можно назвать кариотипическим гомеостазом; наблюдаемые явления характеризуют процессы, составляющие такой гомеостаз.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лобашев М. Е и др. Журн. эволюц. биохим. физиол. 1973. 9 (4): 398-406.
2. Вахтин Ю.Б. 1980. Генетическая теория клеточных популяций. Л.: Наука. 168 с.
3. Дюжикова Н.А. и др. 1997. Генетика. 33 (8): 1077 - 1082.
4. Jacobs P. A. et al. 1961. Nature. 191: 1178.
5. Ford J. H., Russel J. A. 1985. Am. J Hum. Genet. 37: 973 - 983.
6. Martin R. H. 1995. Proc. on chromosome segregation and aneuploidy. Edit. by A. Abbondandolo, B.K. Vig, R.Roi. April 24-29, Sorrento, Italy: 230 - 239.
7. Nath et.al.1995. Chromosoma. 103: 725 - 731.
8. Subak - Sharpe H. et al. 1966. Heredity. 21: 342-343.
9. Cox R. P. et al. 1972. Exp. Cell Res. 74: 251-268.
10. Терци М. 1977. Генетика и животная клетка. М.: Мир, 291 с.
11. Албертс Б. и др. 1994. Молекулярная биология клетки. М.: Мир. Т. 2. 540 с.
12. Wolman S. R. et al. 1964. Cytogenetics. 3: 45 - 61.
13. Wolman S. R. et al. 1980. Cancer Genet. Cytogenet. 2: 39 - 46.
14. Moorhead P. S., Saksela E. 1965. Hereditas. 52: 271-284.
15. Counter C. C. et al. 1992. EMBO. 11: 1921-1929.
16. Reddel R. R. 1998. In: Annales of the New York Academy of Science. 854: 8 - 19.
17. Ducray C. et al. 1999. Oncogene. 18: 4211 - 4223.
18. Фридлянская И. И., 1984. В кн.: Биология клетки в культуре. Л.: Наука. 50 - 100.
19. Турилова В. И. и др. 1998. Цитология. 40 (6): 536 - 548.
20. Hughes D.T. 1968. Nature. 217: 518-523.
21. Catalan J. et al 1995. Cytogenet. Cell Genet. 68: 11 - 16.
22. Мамаева С.Е. 1996. Цитология. 38 (8): 787-814.

23. Mamaev N., Mamaeva S. 1990. *Int. Rev. Cytol.* 121: 233 - 266. 24. Kraemer P.M. et al. 1972. *Adv. Cell Mol. Biol.* 2: 47 - 108. 25. Розанов Ю. М. и др. 1984. *Цитология.* 26 (9) 1079 - 1080. 26. Shaw M. W., Krooth R. S. 1964. *Cytogenet.* 3: 19 - 33. 27. Grewal M. S. et al. 1971. *Exp. Cell Res.* 69: 241-244. 28. Brown J.A., Cohen M.M. 1973. *Canad. J. Genet. Cytol.* 15:135-143. 29. Chen T. R., 1988. *Cancer Genet. Cytogenet.* 33: 77 - 81. 30. American type culture collection. *Catalogue of cell lines and hybridoms.* 1988,1992. Rockville. 31. Филатов М.В. и др. 1988. *Цитология.* 30 (8): 999 -1007. 32. Мамаева С.Е. и др. 1986. *Цитология.* 28 (2):193-203. 33. Zakharov A.F. et al. 1964. *J. Natl. Cancer Inst.* 33: 935-956. 34. Захаров А.Ф. и др. 1966. *Цитология.* 8 (2):193-201. 35. Levan G.1970. *Hereditas.* 64: 85 - 96. 36. Yuasa Y. et al. 1978. *GANN.* 69: 441 - 446. 37. Yamaguchi N., Huh N. 1979. *J. Gen. Virol.* 42: 289 - 296. 38. Lewis I.L. et al. 1981. *Mutat. Res.* 88: 211 - 216. 39. Pillidge L. et al. 1986. *Int. J. Radiat. Biol.* 50: 119 -136. 40. Pillidge L. et al. 1986. *Mutat. Res.* 166: 265-273. 41. Seabright M. A. 1971. *Lancet.* 2: 971 - 972. 42. Sumner A. T. 1972. *Exp. Cell Res.* 75: 304 - 306. 43. Paul J., 1975. *Cell and tissue culture.* Edinburgh: Livingstone. 490 p. 44. Николаенко Н.С. и др. 1990. Тезисы докл. 3 - го Всесоюзного совещания "Культивирование клеток человека и животных". М.: 41 - 44. 45. Chen T. R. 1977. *Exp. Cell Res.* 104: 255 - 262. 46. Mowles J. M., 1988. *Cytotechnology.* 1: 355 - 358. 47. Schmitt K. et al 1988. *J. Immunol. Meth.* 109: 17 - 25. 48. Brown J.A., Cohen M.M. 1973. *Canad. J. Genet. Cytol.* 15:145-154. 49. Welch W. J., Feramisco J.R., 1985. *Mol. Cell Biol.* 5: 1229 - 1236. 50. Laemmli U. K. 1970. *Nature.* 227: 680 - 685. 51. Bradford M. M. 1976. *Anal. Biochem.* 72: 248 - 254. 52. Ashwood-Smith M. J., Friedmann G. B. 1979. *Cryobiology.* 16: 132 - 140. 53. Rudd N. L. et al 1989. *Genome.* 32: 196 - 202. 54. Семенова Е. Г. 1988. *биология.* (1): 17 - 20. 55. Семенова Е. Г. 1989. *Криобиология.* (3): 20 - 24. 56. Навашин М. С., Герасимова Е. П. 1935. *Биол. журн.* 4 (4): 593 - 632. 57. Barnett V. M. 1972. *Radiat. Res.* 51: 131 - 141. 58. Сальникова Т. В., 1976. *Генетика.* 12 (2): 157 - 161. 59. Fulton A. M., Bond D. J. 1984. *Mol. Gen. Genet.* 197: 347 - 349. 60. Вепринцев Б. Н. и др. 1989. *Криобиология.* N 2: 16 - 21. 61. Ryan A.J., Johnson R.T. 1996. *Somat. Cell Mol. Genet.* 22: 177 - 189. 62. Кузьмина С.В. 1983. Малигнизация нормальных клеток в условиях длительного культивирования *in vitro.* М. Наука. 228 с. 63. McGarrity G.J. et al. 1984. *In Vitro.* 20: 1 - 19. 64. Борхсениус С.Н., Чернова О.А. 1989. *Микоплазмы.* Л., Наука. 156 с. 65. Rottem S., Naot Y. 1998. *Trends in microbiology.* 6: 436 - 441. 66. De Vries G., Vogelzang A. 1967. *Lancet.* 1: 160 -161. 67. Mukherjee A. et al. 1993. *Mutat. Res.* 301: 87 - 92. 68. Liu L. F. 1989. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 351 - 375. 69. Charron M., Hancock R. 1991. *Chromosoma.* 100: 97 - 102. 70. Downes C. S. et al.1994. *Nature.* 372: 467 - 470. 71. Suzuki H., Nakane S. 1994. *Biol. and Pharm. Bull.* 17: 222 - 226. 72. Poljak L., Kas E. 1995. *Trends in Cell Biol.* 5: 348 - 355. 73. Sumner A. T. 1995. *Proc. on chromosome segregation and aneuploidy.* Edit. by A. Abbondandolo, B.K. Vig, R.Roi. April 24-29, Sorrento, Italy:121 - 132. 74. Smith P. J. S. et al. 1993. *Biol. Bull.* 185: 293 - 294. 75. Tytell M. et al. 1994. *Neurosci. Res.* 38: 19 - 31. 76. Jovtchev G. et al. 1993. *Biol. Zbl.* 112: 358 - 364. 77. Тихомирова М.М. и др. 1994. *Генетика.* 30 (8): 1097 - 1104. 78. Feder J. H. et al. 1992. *Genes, Development.* 6: 1402 - 1413. 79. Voronin A. et al. 1995. *Abstr. of ESF and Euroconferences meeting.* Grete (Greece): 102. 80. Goswami P. C. et

al. 1996. Mol. Cell. Biol. 16: 1500 - 1508. **81.** Samali A., Cotter T. G. 1996. Exp. Cell Res. 223: 163 - 171. **82.** Mac Donald C. et al. 1991. Exp. Cell Res. 195: 458 - 461. **83.** Earnshaw W. C., Migeon B. R. 1985. Chromosoma. 92: 290 - 296. **84.** Therman et al. 1986. Hum. Genet. 72: 191 - 195. **85.** Zinkowski R. P. et al. 1986. Chromosoma. 94: 243 - 248. **86.** Vig B. K. et al. 1989. Cancer Genet. Cytogenet. 38: 283 - 296. **87.** Fukagawa T. et al. 1999. EMBO. 18: 4196 - 4210. **88.** Sullivan B. A., Willard H. F. 1998. Nature Genet. 20: 227 - 228. **89.** Hastie N. D., Allshire R. C. 1989. Trends Genet. 5: 326 - 321. **90.** Saltman D. et al. 1993. Chromosoma. 102: 121 - 128. **91.** Chong L. et al. 1995. Science. 270: 1663 - 1667. **92.** Ancelin K. et al. 1998. BioEssays. 20: 879 - 883. **93.** Bailey S. M. et al. Pros. Natl. Acad. Sci USA. 1999. 96: 14899 - 14904. **94.** Fett-Conte A. C. et al. 1993. Cancer Genet. Cytogenet. 69: 141 - 145. **95.** Ray F.A. et al. 1992. Mutat. Res. 284: 265 - 275. **96.** Benn P. A. 1976. Am. J. Hum. Genet. 28: 465 - 473. **97.** Fogh J., Fogh H. 1967. Pros. Soc. Exp. Biol. Med. 126: 67 - 74. **98.** Fogh J., Fogh H. 1968. Pros. Soc. Exp. Biol. Med. 129: 944 - 950. **99.** Saksela E. et al. 1960. Exp. Cell Res. 19: 402 - 404. **100.** Сорокина Е. А. и др. 1988. Цитология. 30 (2): 197 - 203. **101.** Gille J.J.P., Joenje H. 1989. Mutat. Res. 219: 231 - 240. **102.** Fenech M. 1995. Proc. on chromosome segregation and aneuploidy. Edit. by A. Abbondandolo, B.K. Vig, R.Roi. April 24-29, Sorrento, Italy: 250 - 257. **103.** McKusick V. 1980. J. Hered. 71: 370 - 391. **104.** Ouspenski I.I. et al. 1995. Proc. on chromosome segregation and aneuploidy. Edit. by A. Abbondandolo, B.K. Vig, R.Roi. April 24-29, Sorrento, Italy: 343-355. **105.** Strauss B. S. 1990. Mutat. Res. 233: 139 - 150. **106.** Montegudo L.V., Arruga M.V. 1991. Caryologia. 44: 85 - 91. **107.** Nikolis J., Kekic V. 1988. Cytogenet. Cell Genet. 47:197 - 200.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Malpoix P., Poljanskaya G. 1979. Dyserythropoietic cytological anomalies preceding changes in proliferation and differentiation. Adv. in Compar. Leukemia Res.: 65 - 66.
2. 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.
3. Глебов О.К., Полянская Г.Г., Пинаев Г.П. 1981. Идентификация изолированных метафазных хромосом. II. Сравнение с узнаваемостью хромосом в составе метафазных пластинок. Цитология. 23 (9): 1042 - 1045.
4. Фридлянская И. И., Полянская Г. Г., Блумквист Е., Татулян С. А., Пинаев Г. П. 1983. Экспрессия признаков, характеризующих клеточную поверхность, в гибридах малигнизированных и немалигнизированных клеток. Цитология. 25 (5): 593 - 600.
5. Полянская Г. Г., Смирнова Т. Д. 1987. Влияние микоплазм на цитогенетические характеристики клеточных линий. Цитология. 29 (9): 1100.
6. Полянская Г.Г. 1988. Кариотипическая характеристика клеточных сублиний почки кенгуровой крысы и фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 30 (6): 732 -738.
7. Полянская Г. Г., Дьяконова М. Ю. 1988. Влияние условий культивирования на кариотипическую структуру клеточной сублинии почки кенгу-

ровой крысы. Цитология. 30 (11): 1355 - 1363.

8. Полянская Г.Г. 1989. Влияние условий культивирования на кариотипическую структуру двух клеточных сублиний фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 31(7): 807-817.

9. Полянская Г. Г., Семенова Е. Г., Шубин Н. А. 1990. Влияние криоконсервации на цитогенетические характеристики клеточной сублинии фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 32 (3): 256 - 265.

10. Полянская Г.Г., Фридлянская И.И. 1991. Изменчивость хромосом индийского мунтжака в гибридах соматических клеток. Цитология. 33 (6): 86-94

11. Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н. 1992. Влияние микоплазменной контаминации на кариотипическую структуру клеточной линии индийского мунтжака. Цитология. 34 (3): 82-88.

12. Freedlanskaya I. I., Poljanskaya G.G., Efremova T.N., Pinaev G.P. 1992. Animal cell culture collection in Russia. In vitro. 28 (3, part 2): P169A

13. 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.

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

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

16. Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н., Фридлянская И. И. 1994а. Деконтаминация культивируемых клеток от микоплазм с помощью ципрофлоксацина: отсутствие гено- и цитотоксических эффектов. Цитология. 36 (6): 534.

17. Полянская Г.Г., Сизова Л.С., Ефремова Т.Н., Фридлянская И.И. 1994б. Цитогенетическое исследование линии клеток легкого китайского хомячка V-79, инфицированной микоплазмой *Mycoplasma arginini* и деконтаминированной с помощью ципрофлоксацина. Цитология. 36 (8): 880-887.

18. Freedlanskaya I. I., Drexler H., MacLeod R., Efremova T. N., Voges M., Poljanskaya G. G. 1994. Mycoplasma infection and ciprofloxacin mycoplasma eradication in mammalian cell lines; Cytogenetical assay. IOM Lett. 3, P126: 308.

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

20. Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н., Сизова Л. С. 1996. Влияние микоплазменной контаминации на кариотипическую изменчивость в клеточных линиях с разной структурой кариотипа. Цитология. 38 (2): 243 -244.

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

22. Полянская Г.Г., Кинев А.В., Сакута Г.А., Асеева Е.В. 1997. Влияние внеклеточного белка теплового шока на хромосомную изменчивость в кле-

точной культуре фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 39 (11): 1070-1082.

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

24. Полянская Г.Г. 1999. Особенности количественной изменчивости кариотипа в клеточных сублиниях фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 41 (3/4): 305.

25. Полянская Г. Г., Самокиш В.А. 1999а. Особенности количественной изменчивости кариотипа в клеточной линии фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 41 (8): 729 - 734.

26. Полянская Г.Г., Самокиш В.А. 1999б. Особенности количественной изменчивости кариотипа в клеточных сублиниях фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 41 (9): 747 - 751.

27. Полянская Г.Г., Самокиш В.А. 1999в. Особенности количественной кариотипической изменчивости в клеточной линии почки кенгуровой крысы. Цитология. 41 (9): 758 - 763.

28. Полянская Г.Г., Самокиш В.А. 1999г. Исследование количественной кариотипической изменчивости при индукции хромосомной нестабильности в культивируемых клетках фибробластов кожи индийского мунтжака. Цитология. 41 (9): 752 - 757.

29. Poljanskaya G. G., Efremova T. N., Sakuta G. A. 1999. Karyotypic variability of "markerless" continuous cell lines. Mol. Biol. Cell, Suppl. Abstracts 39<sup>th</sup> ASCB annual meeting. 10: 282.

30. Каталог Российской коллекции клеточных культур, 1999., отв. ред. Пинаев Г.П., Полянская Г.Г. Санкт - Петербург Омск: ОмГПУ. Биологическая серия, вып. 5. (на русском и англ. яз.) 429 с.

31. Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н., Сакута Г.А. 2000а. Влияние микоплазменной контаминации клеточной линии легкого эмбриона человека MRC-5 на кариотипическую изменчивость. Цитология. 42 (2): 190 - 195.

32. Полянская Г.Г., Ефремова Т.Н., Сакута Г.А. 2000б. Кариотипическая изменчивость в длительно культивируемых клеточных линиях без маркерных хромосом. Тезисы II съезда ВОГиС. Санкт - Петербург. 1: 246 - 247.

33. Полянская Г.Г. 2000. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях (Обзор). Успехи совр. биол. (в печати)

34. Полянская Г. Г., Ефремова Т. Н. 2000. Влияние микоплазменной контаминации на кариотипическую изменчивость клеточной линии карциномы шейки матки человека M HeLa clone 11. Цитология. (в печати).

Сверстано и отпечатано  
в Типографском центре  
малой оперативной полиграфии  
**ЗАО «Познание»**  
**191186, Санкт-Петербург, а/я 623**  
Тел./факс (812) **534-3068**

Сдано в набор **26.04.2000**. Подписано к печати **28.04.2000**.  
Формат 84x108, 1/32. Бумага книжно-журнальная. Гарнитура «Таймс».

Печ. листов 2,5. Тираж **120** экз.  
Заказ № **65**.