

УДК 575

**КЛОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ  
СТВОЛОВОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ G1**

Т.Т. ГЛАЗКО, А.П. ЯЦИШИНА\*, О.В. ПИДПАЛА®, Е.А. ЕВСТАФЬЕВА, Л.Л. ЛУКАШ\*

Выполнен сравнительный анализ кариотипической изменчивости популяций эмбриональной стволовой клеточной линии G1 и полученной из нее сублинии OA, селективируемой по признаку злокачественной трансформации (независимости роста от сывороточных факторов). Впервые описан новый механизм кариотипической изменчивости, связанный с повышенной ломкостью хромосом в околоцентромерных районах, что приводит к образованию мелких хромосом с перичентромерными гетерохроматиновыми блоками и лишенных центромер больших хромосомных фрагментов. Представлены данные, свидетельствующие о том, что единичная клетка (клетки), потомством которой является сублиния OA с трансформированным фенотипом, по хромосомному составу ближе к нормальному полиплоидизированному кариотипу мыши, чем доминирующие клоны линии G1. Обсуждаются возможные механизмы гетерогенности клеток по хромосомному составу.

Плюрипотентные эмбриональные стволовые клеточные линии (ЭСК) в последние годы широко исследуются в связи с возможностями их использования при разработке методов клеточной терапии, а также при получении трансгенных млекопитающих. В то же время обнаруживается сходство ЭСК с опухолевыми клетками по таким характеристикам, как неограниченность клеточных делений, способность к цитодифференцировке в различных направлениях, широкая фенотипическая изменчивость [10, 11]. При определении трансформированного (опухолевого) фенотипа клеток рассматривают такие признаки, как зависимость роста клеток от субстрата, от ростовых сывороточных факторов, чувствительность клеток к контактному торможению [7, 15]. По некоторым наблюдениям при культивировании ЭСК возможно

появление сублиний, несущих такие признаки [2, 3].

Предполагается, что в основе злокачественной трансформации клеток может лежать накопление кариотипических изменений [4, 12]. Однако до сих пор такие изменения и механизмы их появления остаются недостаточно исследованными. Традиционно в качестве характеристик кариотипической изменчивости в клеточных популяциях рассматривают частоты анеуплоидных и полиплоидных клеток, внутри- и межхромосомных перестроек. При этом анализ полученных данных осложняется тем, что сами эти характеристики являются сложными признаками, и изменчивость каждой из них может зависеть от целого ряда причин. Так, например, полиплоидия может быть не только следствием отклонения от нормального хода митоза, но и результа-

---

\* Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина.

том слияния клеток [6]; анеуплоидия возникает в результате как утраты или нерасхождения хромосом, так и многополюсных митозов [9].

Для того чтобы оценить возможные пути дестабилизации кариотипа ЭСК, связанные с появлением клеток с признаками опухолевой трансформации, в настоящей работе выполнен сравнительный кариотипический анализ исходной ЭСК линии G1 (15-й пассаж), выделенной из нее на 35-м пассаже сублинии ОА, проявившей способность к независимому росту от сывороточных факторов, и миелом линий P3-X63-Ag 8.653, NSO, SP2/0.

### Материалы и методы

Линия G1 была получена из полового бугорка 12,5 дневного эмбриона мыши линии BALB/c [2]. Сублиния ОА выделена из линии G1 на 35-м пассаже путем высева клеток на среду, обедненную сывороточными факторами (менее 1%) [2, 3]. Для сравнения с ЭС клетками выполнен также кариотипический анализ 3 постоянных клеточных линий миелом, происходящих от той же лабораторной линии мышей BALB/c, миеломы P3-X63-Ag 8.653, NSO и SP2/0 (предоставлены для исследований Н.Л.Галахарь, Институт цитологии и генетики СО РАН). Методика получения метафазных пластинок детально описана в работе [1]. Клетки суспендировали и инкубировали 30 мин в растворе KC1 (0,56%) при 37 °C. Хромосомы фиксировали смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1), трижды меняя фиксирующий раствор. Препараты раскапывали на холодные мокрые стекла, высушивали и окрашивали красителем Гимза («Merck», Германия). Окрашенные цитогенетические препараты анализировали с помощью бинокулярного микроскопа Carl Zeiss при увеличении в 1000 раз. Метафазные пластинки фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата Canon (PowerShot G6, Great Britain). Индивидуальное типиро-

вание хромосом проводили в соответствии с данными Cowell J'.K. [5]. Для отдельных метафазных пластинок с наименьшим количеством хромосомных наложений составляли кариограммы. Количество хромосом и их качественный состав анализировали на фотографиях метафазных пластинок.

Изменчивость клеточных популяций по числу хромосом (Xp) характеризовали по следующим показателям: пределам варьирования, доле клеток с модальным числом Xp и ширине модального класса. В связи с выраженным разнообразием ЭС клеток по количеству Xp (условно модальное число) учитывали количество клеток (в % от общего количества рассмотренных клеток) с близкими числами Xp, которые встречались чаще, чем другие. Для того чтобы более подробно оценить сходства и отличия клеточных популяций по количеству Xp, было рассмотрено распределение клеток с количеством Xp гипер ди-, три-, тетра-, пента-, и гексаплоидных.

### Результаты и их обсуждение

Результаты выполненного анализа изменчивости исследованных клеточных популяций по числу Xp представлены в табл. 1 и 2. Видно, что наиболее гетерогенной по всем характеристикам оказалась исходная популяция ЭС клеток, линия G1, 15-й пассаж. Постоянные клеточные линии миелом почти совпадали друг с другом по таким характеристикам, как пределы варьирования, модальное число Xp, долям клеток с модальным числом Xp. Сходными с типичными для миелом были пределы варьирования у клеток сублинии ОА на 14-м и 26-м пассажах, однако условные модальные числа Xp были почти в 2 раза больше. Близкими пределы варьирования были и у клеток сублинии ОА на 40-м пассаже, однако условные модальные числа Xp этих клеток сдвигались в сторону уменьшения количества Xp, еближе-

Таблица 1

**Гетерогенность клеток по количеству хромосом  
в исследованных клеточных популяциях**

Линия или сублиния	Число исследованных клеток	Число хромосом в клетке		Доля клеток с модальным числом хромосом, %
		пределы варьирования	модальное	
Миелома P3-X63-Ag 8.653	92	45-133	60-65	46
Миелома NS-O	100	48-126	58-60	47
Миелома SP2/0	90	49-115	61-64	40
Линия G1, пассаж 15	50	40-173	40; 108; 117; 126-127	6; 8; 6; 18
Сублиния OA линии G1				
Пассаж 14	74	58-126	110-112; 114-117; 123-126	14; 35; 12
Пассаж 26	43	50-125	110-111; 113-115	21; 26
Пассаж 40	70	55-134	71-79; 90-95	23; 19

Таблица 2

**Частота встречаемости клеток с около ди-, три-, тетра-, пента-, и гексаплоидными наборами хромосом в исследованных клеточных популяциях**

Линия или сублиния	Гипердиплоиды (40-50 хромосом, %) / гипотриплоиды (51-59 хромосом, %)	Гипертриплоиды (60-70 хромосом, %) / гипотетраплоиды (71-79 хромосом, %)	Гипертетраплоиды (80-90 хромосом, %) / гипопентаплоиды (91-99 хромосом, %)	Гиперпентаплоиды (100-110 хромосом, %) / гипогексаплоиды (111-119 хромосом, %)	Гипергексаплоиды (120-130 хромосом, %) / более 130 хромосом)
Миелома P3-X63-Ag 8.653	12/28	55/2	0/1	0/2	0/0
Миелома NS-O	4/51	36/0	0/1	0/5	3/0
Миелома SP2/0	1/36	54/1	3/2	3/1	0/0
Линия G1, пассаж 15	8/2	12/4	4/4	16/12	26/0
Сублиния OA линии G1					
Пассаж 14	0/3	0/5	5/5	22/42	18/0
Пассаж 26	0/2	0/0	5/2	14/65	7/0
Пассаж 40	0/3	16/23	19/17	16/4	0/3

нию их с типичными для исследованных миелом.

Во всех трех постоянных линиях миелом преобладали гипо- и гипертриплоиды (51-70 хромосом; 83, 87 и 90% клеток). В линии ЭСК G1 на 15-м пассаже наиболее часто встречались 3 группы клеток: гипертриплоиды (12%), гиперпентаплоиды (16%), гипо- и гипергексаплоиды (38%).

В последовательных пассажах сублинии OA наблюдались изменения структуры клеточных популяций по сравнению с исходным 15-м пассажем линии G1: от 14-го до 40-го пассажа исчезают гипергексаплоидные клетки; на пассажах 14 и 26 преобладают гиперпентаплоидные и гипогексаплоид-

ные, а на пассаже 40 — уже гипотетраплоидные, гипопентаплоидные клетки. То есть обнаруживается сдвиг структуры клеточных популяций в сторону увеличения представленности клеток с меньшим числом Хр (меньшим геномом), что, по-видимому, может быть связано с селективными преимуществами клеток с относительно менее продолжительным клеточным циклом.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при сходных пределах варьирования клеток по числу Хр клеточные популяции сублинии OA, селективируемой по признаку трансформированного фенотипа (независимость роста от сывороточных факторов), от-

личаются от постоянных опухолевых линий большей гетерогенностью клеток по количеству Хр и наличием изменений клеточного состава в сторону накопления гипотетраплоидных и гипопентаплоидных клеток, а также уменьшения пента- и гексаплоидных вариантов.

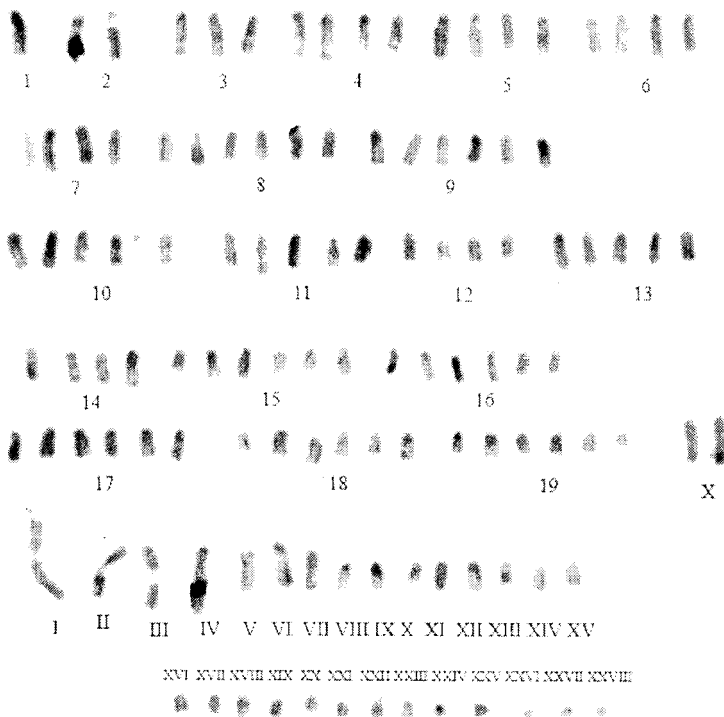
Во всех клеточных популяциях обнаруживается высокая частота центрических слияний (робертсоновских транслокаций — РБ). В постоянных клеточных линиях P3-X63-Ag 8.653, NS-O, SP2/0 они встречались с частотой  $1,6 \pm 0,2$ ;  $1,7 \pm 0,3$ ;  $2,4 \pm 0,3$  соответственно, причем среди них регулярно присутствовали изохромосомы РБ (9; 9), (15; 15), (19; 19).

В исходной линии ЭС G1 на 15-м пассаже они встречались с примерно такой же частотой ( $2,1 \pm 0,3$ ). Не уменьшалась частота их встречаемости и у сублинии ОА на 14, 26, 40-м пассажах ( $2,2 \pm 0,3$ ;  $2,2 \pm 0,2$ ;  $1,9 \pm 0,2$  соответственно). В то же время в клетках ЭС, в отличие от миеломных линий, не

встречались изохромосомы; центрические слияния (РБ) наблюдали между гетерологичными Хр.

В метафазных пластинках постоянных опухолевых линий примерно 30-50% Хр представлены перестроенными хромосомами, в которые входили РБ, крупные перестроенные и нетипируемые мелкие Хр, причем, как правило, мелких нетипируемых Хр было примерно в 2 раза меньше, чем крупных перестроенных. В миеломных линиях отсутствовали неперестроенные Хр 6, 12 и X. Примеры типичных перестроенных Хр для миеломной линии P3-X63-Ag 8.653 опубликованы нами ранее [1], хромосомный состав миелом NS-O, SP2/0 был к нему близок.

Клетки ЭС существенно отличались от миеломных линий присутствием неперестроенных копий Хр 6, 12 и X, меньшим количеством перестроенных Хр и преимущественной представленностью среди них мелких нетипируемых Хр (например, линия G1, 15-й пассаж, рис. 1; 6 крупных перестро-



**Рис. 1.** Кариограмма метафазной пластинки линии G1 на 15-м пассаже.

Арабскими цифрами (1-19, X) обозначены неперестроенные хромосомы. Римскими цифрами (I - XXVIII) обозначены перестроенные хромосомы. I - III — робертсоновские транслокации. Всего 118 хромосом, 121 плечо с учетом плеч робертсоновских транслокаций. Обнаруживается дефицит (1-4 копии) крупных хромосом (хромосомы 1, 2, 3, X) по сравнению с мелкими (5-6 копий)

енных Хр и 22 мелких). Примеры кариограмм метафаз сублинии АО на 14, 26, 40-м пассажах представлены на рис. 2 и 3.

Таким образом, клетки ЭС качественно отличались от постоянных опухольных линий большим количеством мелких Хр, несущих типичные для перичентромерных районов акроцентрических Хр мыши большие гетерохроматиновые блоки, а также относительно малым количеством крупных перестроенных Хр, при сходной частоте встречаемости РБ в клетках в обеих группах клеточных популяций.

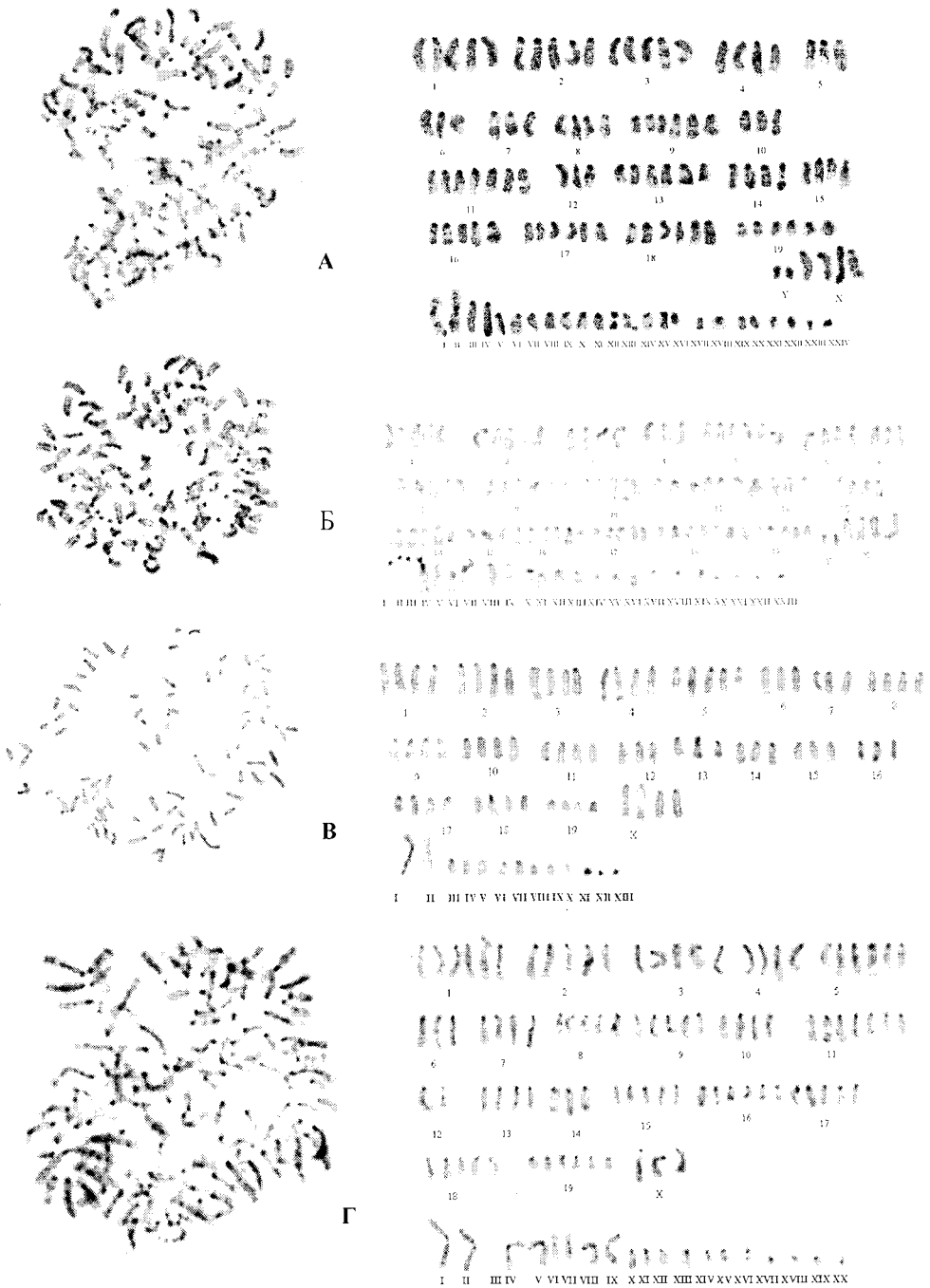
Для выявления гетерохроматиновых блоков перичентромерных районов Хр мыши выполнено С-окрашивание [13] клеток сублинии ОА на 14-м и 26-м пассажах. Обнаружено, что одним из путей формирования наблюдаемых нами в больших количествах в метафазных пластинках ЭС мелких нетипизируемых хромосом может быть отрыв перичентромерных гетерохроматиновых блоков от основного тела Хр. Примеры таких событий представлены на рис. 4. То есть наблюдаемое нами увеличение количества клеток с меньшим числом Хр в пассажах сублинии ОА по сравнению с исходной линией G1 может осуществляться за счет такого специфического разрушения Хр, с последующей утратой мелких Хр, несущих центромерные районы, и крупных фрагментов, лишенных центромер.

Стрелками указаны перичентромерные гетерохроматиновые блоки, автономно лежащие рядом с основным телом аутосом. А — робертсоновское слияние между аутосомой и мелкой хромосомой — между двумя перичентромерными гетерохроматиновыми блоками обоих хромосом. Б — двумя стрелками указаны перичентромерные гетерохроматиновые блоки, оторвавшиеся от основного тела аутосомы

Как отмечалось нами ранее [1], клетки постоянных миеломных линий представляют смесь клеточных клонов, несущих разные маркерные Хр. В то

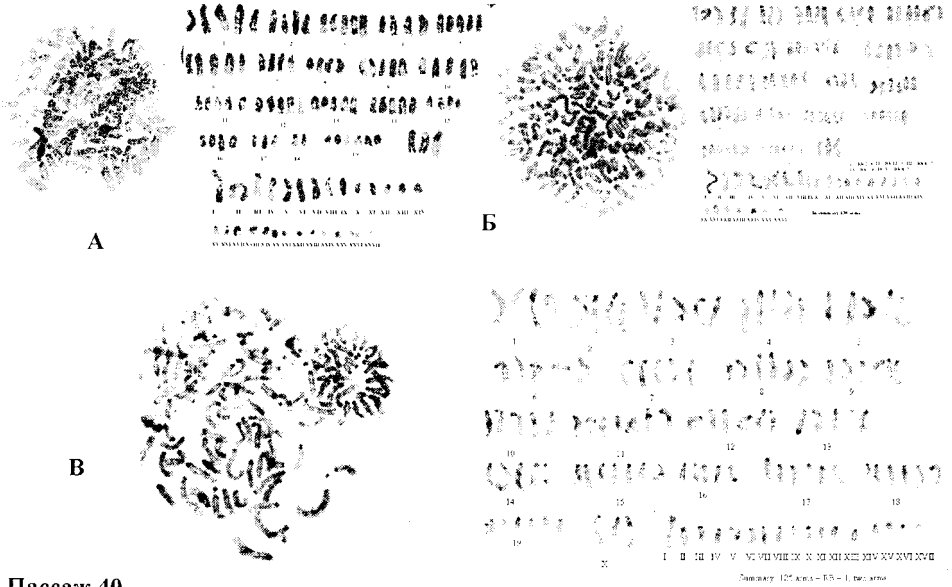
же время в этой смеси, несмотря на постоянно возникающие новые перестройки, межклеточные слияния, поддерживается определенный баланс клеток как по числу Хр в них так и по представленности клонов с разным хромосомным составом. В этом отношении клетки сублинии ОА, селективируемые на независимость роста от сывороточных факторов, отличаются от миеломных линий тем, что в них, на пассажах 14, 26 и 40 идет отбор клеток, по-видимому, преимущественно в сторону уменьшения количества Хр, а не накопления вариантов хромосомных транслокаций (см. табл. 1, 2).

Судя по выделенным условно модальным классам Хр на пассажах 14 и 26 сублинии ОА, предковые клетки этой сублинии должны были содержать не менее чем гексаплоидный набор Хр. Причем, если по количеству Хр такая предковая клетка (или несколько клеток) совпадала с основным модальным числом Хр у исходной клеточной линии G1 на 15-м пассаже (126-127 Хр), то по хромосомному составу она (они) существенно отличалась от типичного для исходной линии по 2 обстоятельствам. Во первых, в клетках сублинии ОА на 14-м и 26-м пассажах присутствовала Хр Y (см. рис. 2) с частотой 20% и 10% соответственно, не выявленная ни в одной метафазной пластинке линии G1 на 15-м пассаже. Следовательно, в линии G1 сохранялись одиночные клетки, содержащие Хр Y и по этому признаку близкие к первичной клеточной популяции эмбриона с нормальным кариотипом самца мыши. Во-вторых, для многохромосомных метафаз линии G1 на 15-м пассаже был типичен определенный дефицит копий крупных Хр (Хр 1~7, X) по сравнению с хромосомами среднего и мелкого размера (см. рис. 1), что, в частности, по Хр 1 и 2 не было характерным для клеток сублинии ОА (см. рис. 2, 3). То есть по отсутствию дефицита отдельных крупных перестроенных Хр, наличию Хр Y клетки



**Рис. 2.** Кариогаммы метафазных пластинок сублинии ОА, пассаж 14.  
 А, Б, В, Г — примеры кариогамм, свидетельствующие о гетерогенности клеток по хромосомному составу. Арабскими цифрами (1-19) обозначены неперестроенные хромосомы; римскими цифрами (I - XXVIII) — перестроенные хромосомы. X и Y — половые хромосомы

Пассаж 26



Пассаж 40

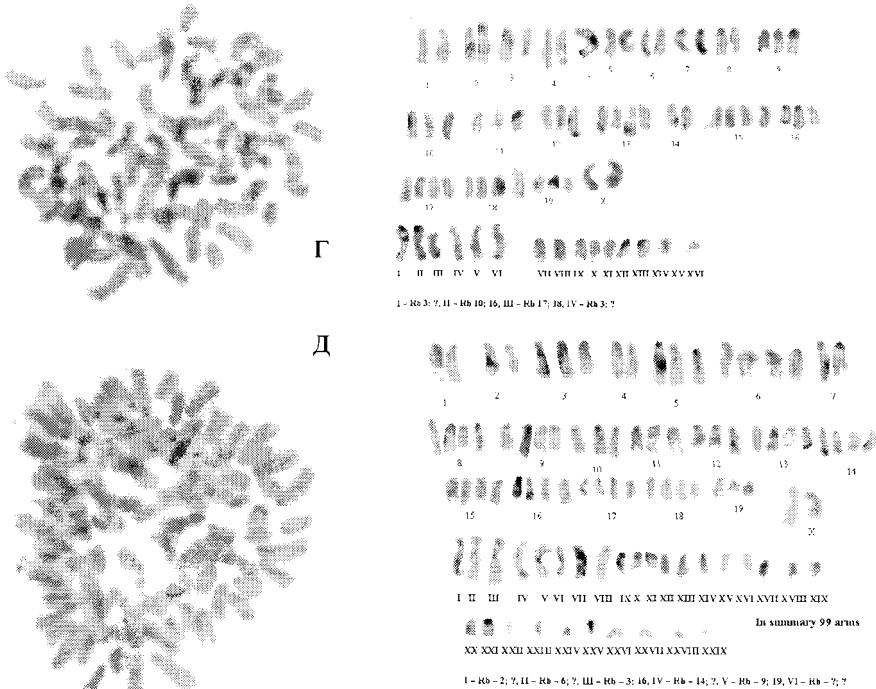
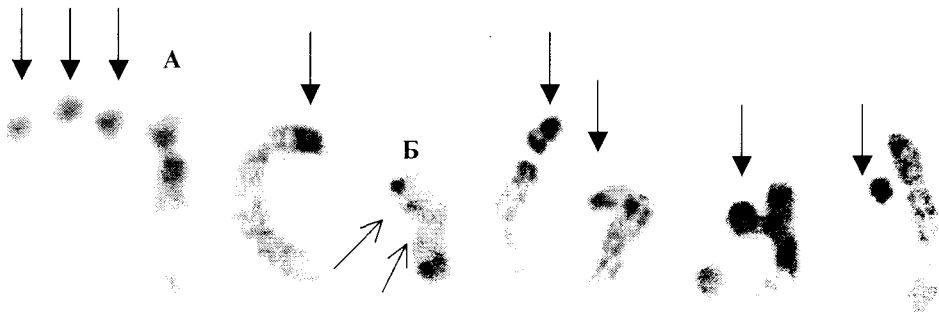


Рис. 3. Кариогаммы метафазных пластинок сублинии ОА, пассажи 26 (А, Б, В) и 40 (Г и Д). Представлены разные кариогаммы, свидетельствующие о гетерогенности клеток по хромосомному составу.

Арабскими цифрами (1-19) обозначены неперестроенные хромосомы; римскими цифрами (I - XXVIII) — перестроенные хромосомы



**Рис. 4.** Повышенная ломкость перичентромерных районов в клетках сублинии ОА (пассажи 14 и 26, С-окрашивание для выявления гетерохроматиновых перичентромерных блоков)

сублинии ОА на 14-м и 26-м пассажах оказывались более близки к полиплоидизированным нормальным клеткам мыши, чем исходная линия G1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что сублиния ОА, несущая классический признак опухолевого фенотипа — независимость роста от сывороточных факторов — сформировалась из одиночной клетки (клеток), хромосомный состав которой был ближе к нормальному полиплоидизированному хромосомному набору мыши и нетипичен для преобладающих клонов клеток в исходной линии G1.

В общем, это соответствует представлениям о селекции клеточных клонов в процессе злокачественной трансформации [4]. Важно подчеркнуть, что в данной модели наиболее перспективной для формирования сублинии с трансформированным фенотипом оказалась клетка, по составу хромосом наиболее близкая к полиплоидизированной норме, присутствие которой не удается уловить в преобладающих клонах клеток линии G1. Из этого следует, что практически невозможно исключить в ЭСК линиях присутствие единичных клеток, способных к опухолевому росту.

Механизмы же дестабилизации хромосомного аппарата, приводящие к генетической гетерогенности клеток при их культивировании, а также при опухолевом росте, остаются неизвестны-

ми до сих пор. И если в данном исследовании удалось наблюдать один из механизмов утраты Хр (уменьшения их числа) за счет отрыва перичентромерных гетерохроматиновых блоков у акроцентрических Хр мыши, то пути увеличения количества Хр могут оказаться еще более сложными.

В последние годы в литературе интенсивно накапливаются экспериментальные данные о существенной роли межклеточных слияний в процессах цитодифференцировки, злокачественной трансформации клеток [8, 14, 16]. Судя по разнообразию клеток по одновременному присутствию/отсутствию различных цитогенетических маркеров у постоянных опухолевых линий и ЭСК популяций, такой путь полиплоидизации может вносить существенный вклад и в генетическую гетерогенность рассмотренных нами клеточных популяций. Межклеточные слияния с последующей утратой Хр могли бы объяснить пути формирования групп клеток с модальными классами, близкими к кратным нечетным наборам Хр — три, пента-, а также гексаплоидам (см. табл. 2, линия G1 пассаж 15). Этот процесс мог бы реализоваться путем формирования исходных тетраплоидов, последующим уменьшением в них количества хромосом до околотриплоидного и далее — слиянием последних с диплоидными, с образованием пентаплоидных вариантов



или друг с другом, с формированием околотетраплоидных клеток. Такой вариант событий мог бы объяснить относительно редкую частоту встречаемости тетраплоидных клеток и отсутствие метафаз с 8 наборами хромосом. В то же время очевидно, что такой путь формирования генетической изменчивости преимущественно реализуется в клеточных популяциях исходной линии G1 на 15-м пассаже или ранее, но не в популяциях сублинии OA.

Полученные данные позволяют сделать следующее заключение. Сублиния OA с признаками неопластического фенотипа является потомком клетки (клеток) с кариотипом, существенно отличающимся от типичного для преобладающих клеточных клонов исходной эмбриональной клеточной линии G1. Структура клеточных популяций сублинии OA при пассировании претерпевает дальнейшие изменения, направленные в сторону увеличения доли клеток с уменьшенным числом Хр. Одним из механизмов такого изменения может быть повышенная ломкость Хр в перичентромерных районах с образованием мелких Хр с центромерами и лишенных центромер больших фрагментов. Можно ожидать, что недифференцированная исходная ЭСК линия G1 и дифференцирующаяся в сторону опухолевого фенотипа сублиния OA отличаются друг от друга по механизмам формирования генетической изменчивости клеток: в случае клеток G1, по-видимому, преобладают процессы полиплоидизации за счет межклеточных слияний, для клеток OA типичны различные пути утраты отдельных Хр.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Глазко Т.Т. Кариотипические особенности ряда клональных линий межвидовой гибридомы мышь-норка // Цитология, 1988. Т. 30. № 5. С. 597-605.
2. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Шопала О.В. и др. Одержання нових ліній стовбурових клітин мипі і вивчення впливу міжрооточення на їхню карттишчну мшлівість in vitro // Физиология и биохимия культурных растений, 2006. Т.38. № 2. С. 140—148. — 3. Яцишина А.П., Шопала О.В., Кочубей Т.П., Лукаш Л.Л. Спонтанна каріотитчна еволюція клітин in vitro // Фактори експериментальної еволюції організмів.-Кшв:КВІЦ, 2004. С. 88-92. — 4. Cahill D.P., Kinzler K.W., Vogelstein B., Lengauer C. // Trends in Biology Science, Millenium Issue, 2000. P. M57-M60. — 5. Cowell J.K. // Chromosoma, 1984. Vol. 89. № 4. P.294-320. — 6. Fortuna M.B., Dewey M.J., Furmanski P. // Int. J. Cancer, 1989. Vol. 44. P. 731-737. — 7. Fry D.G.,Hurtin P.J.,Marker V.M.; McCormick J.J. // Mutat. Res, 1988. Vol. 199. P. 341-351. — 8. Garbade J, Schubert A, Rastan AJ. et al. //Eur J Cardiothorac Surg., 2005. Vol. 28. № 5. P. 685-691. — 9. Gilvarry U., Farrell D., Lynch V. et al. // J Cancer Res, 1990. Vol. 50. P. 3390-3393. — 10. Iwasa Y, Nowak MA, Michor F. // Genetics, 2006. Apr;172(4):2557-66. — 11. Michor F, Nowak MA, Iwasa Y. // Curr Pharm Des. 2006; 12(3):261-71. — 12. Nicolson G.K. // Cancer Res, 1987. Vol. 47. P. 1473-1487. — 13. Ozkindy C., Mitelman F. //Hereditas, 1979. Vol. 90. N 1. P. 1-4. — 14. Rizvi A.Z., Swain J.R., Davies P.S. // Proc Natl Acad Sci U S A , 2006. Vol. 103. № 16. P. 6321-6325. — 15. Straus D.S., Jonasson J., Harris H. // J. Cell Sci., 1977. Vol. 25. P. 73-78. — 16. Vassilopoulos G., Russell D.W. // Curr Opin Genet Dev., 2003. Vol. 13. № 5. P.480-485.

## SUMMARY

The comparative analysis of karyotype variability of stem embryonic cell line G1 and obtaining from it the subline OA, which was selected on the trait of the cell neoplastic transformation (independent grow of serum factors), was carried out. The new mechanism of karyotype variability, related with the high fragile in pericentromere region, leading to the appearing of little size chromosomes with centromere heterochromatin blocks and large chromosomes without them was firstly described. It was obtained data, that ancestor cell (cells) for subline AO with neoplastic transformed phenotype was (were) more close to normal polyploid karyotype of mice, than dominated clones of embryonic cell line G1. The possible mechanisms of cell heterogeneity in chromosome composition were discussed.