

ЯВЛЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ ХРОМОСОМ В ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА *RATTUS NORVEGICUS*

Л. И. Чабала, А. И. Сливкин, В. А. Чабала

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 13.03.2011 г.

Аннотация. Открыто новое явление устойчивых структурно-функциональных преобразований хромосом в популяции клеток костного мозга *Rattus norvegicus* на стадии метафазы и у каждой особи. Морфологическая структура у двух наименьших пар хромосом изменялась от акроцентрической до метацентрической. В результате выделено три типа хромосомных наборов, отличающихся количеством метацентрических и акроцентрических хромосом. Эти стабильные преобразования физической организации хромосом указывают на неизвестный ранее своеобразный путь реализации генома стволовых клеток в генетические программы специализированных клеток крови.

Ключевые слова: полиморфизм хромосом, хромосомные наборы, костный мозг, стволовые клетки, пролиферация, клетки крови.

Abstract. Phenomenon of persistent structural and functional chromosome transformations in *Rattus norvegicus* marrow biocytoculture has been discovered. It occurred at every individual while metaphase. Morphological structure of two smallest chromosome pairs changed from acrocentric to metacentric. Three types of chromosome sets differing in ratio of metacentric and acrocentric forms were distinguished. These stable transformations indicate previously unknown specific way of stem cells genome realization in genetic programs of specialized blood cells.

Keywords. chromosome polymorphism, chromosome sets, marrow, stem cells, proliferation, blood cells.

ВВЕДЕНИЕ

До наших исследований были опубликованы многочисленные данные о полиморфизме хромосом при анализе клеток костного мозга у млекопитающих, и это явление объясняли эволюцией вида. Кроме того, сложилось представление, что у всех представителей одного вида одинаковый кариотип по числу хромосом и их морфологии [1] и с учетом этого составляли карты хромосом [2].

У крыс *Rattus norvegicus* Berkenhout, объекта наших исследований, также рассматривали полиморфизм хромосом с этих же позиций, при этом отмечали в диплоидных клетках 42 хромосомы и отдельные признаки их морфологии. Классификацию хромосом с распределением их на четыре группы с учетом морфологии предложили в 1963 году [3]. Затем, спустя десятилетие, в 1973 году она была усовершенствована на основе дифференциальной окраски [2], провели идентификацию хромосомных пар и половые хромосомы поместили в конце кариограммы. В результате в кариотипе выделили 7 пар метацентрических хромосом, 2 —

субметацентрические, 3 — субтелоцентрические и 9 пар акроцентрических.

Но были опубликованы и другие данные. Так, в одних популяциях крыс отмечали 2 пары субтелоцентриков и 11 акроцентриков [4, 5], в других — 3 пары субтелоцентриков и 10 акроцентриков [6], в третьих — 4 пары субтелоцентриков и 9 акроцентриков [7]. При этом выделяли одинаковое число — 7 пар метацентриков. И это явление объясняли надвидовыми различиями.

Кроме того, описан и полиморфизм для трех пар хромосом: 3, 12 и 13 на межпопуляционном и внутривидовом уровнях. Вследствие изменения длины плеч гомологи у этих пар были телоцентрические, или субтелоцентрические, а иногда в гетероморфном состоянии [5, 6].

Таким образом, структурный полиморфизм метафазных хромосом в клетках костного мозга крыс в литературе отмечали уже несколько десятилетий до наших исследований и как явление внутри- и межпопуляционной изменчивости вида. Информация об изменениях метафазных хромосом на уровне популяции клеток костного мозга особи до наших исследований отсутствовала.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для опытов использовали лабораторных белых крыс линий Август, Вистар и беспородных обоего пола из питомников «Столбовая» и «Белый мох», также серых диких крыс самцов, а всего 375 животных.

Приготовление микропрепаратов из костного мозга и крови, рутинную и дифференциальную окраску, микрофото съемку осуществляли по ранее описанным методикам [8].

Идентификацию морфоструктуры у хромосом проводили на микрофотографиях и под микроскопом визуально на основе положения центромеры и по принятому соотношению линейных параметров плеч: у метацентрических хромосом — 1—1,7, субметацентрических — 1,7—3, субтелоцентрических — 3,0—7,0 и акроцентрических — 7 и более [9].

Для измерения хромосом использовали усовершенствованный нами метод [10], позволяющий более точно снимать параметры в микрометрах с рисунков или отображения с негатива.

Статистическую обработку данных делали на основе рекомендаций Е. К. Меркурьевой [11], Е. М. Четыркина, И. Л. Калихмана [12] и по соответствующим программам с использованием ЭВМ. Находили ошибку средней арифметической и средней взвешенной по методу Стьюдента, также определяли достоверность разности между средними арифметическими двух выборок.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для анализа полиморфизма хромосом в популяции клеток костного мозга крыс нами разработана новая условная классификация с учетом размера, формы и структурной изменчивости [8].

Хромосомы распределили на 7 групп от А до G в порядке уменьшения линейных параметров, с учетом морфологической структуры и дифференциальной окраски различных пар. Аутосомные пары пронумеровали с 1 по 20, последовательность их расположения совпадала с ранее принятой классификацией лишь по 1—6 паре. Для идентификации половых хромосом использовали принятый принцип исключения их из гомологичных пар с учетом индивидуальной морфологии и особенностей окраски.

В результате первые пять групп: А, В, С, D и E состояли из хромосом с относительно стабильной морфологией. Группы А, В и С включают наиболее крупные хромосомы, но А имеет одну пару субтелоцентриков (1), В — пять пар акроцентриков и X-хромосому (2-X-6), а С объединяет три пары метацентрических аутосом (7—9). В следующих

двух группах D и E содержатся по три пары средних по размерам хромосом, в первой из них акроцентрические (10—12), а во второй — метацентрические (13—15).

Две последние группы F и G объединяют остальные самые мелкие хромосомы, но в первой из них акроцентрические, среди которых и Y-хромосома, а во второй — метацентрические. В этих группах находились две пары хромосом с лабильной формой вследствие изменения длины плеч. Фенотипическая структура 18 и 19 пар варьировала от акроцентрической до метацентрической, поэтому их относили или к группе F или G. В результате выявили три типа хромосомных наборов в популяции клеток костного мозга особи, и по количеству пар метацентриков в группе G их обозначили как типы I, II и III. Тип I включал 26 акроцентрических и 14 метацентрических, тип II — 24 акроцентрических и 16 метацентрических, тип III — 22 акроцентрических и 18 метацентрических хромосом, а также в каждом из них имелось по одной паре крупных субтелоцентрических аутосом [8, 13]. Это явление обнаружено у беспородных и линейных белых крыс, а также и диких серых.

Дифференциальные G- и C-окраски хромосом, используемые многими исследователями для выяснения сущности структурного полиморфизма хромосом на уровне вида, в наших экспериментах не представили информации для объяснения явления структурного полиморфизма хромосом на уровне популяции клеток костного мозга крысы.

Затем мы провели морфометрический анализ 40 метафазных пластинок: типа I было 9, типа II — 17 и типа III — 14 шт., которые получены от двух крыс самцов и после воздействия колхицина 2 часа. Среди них выявлены у последней 20-ой метацентрической пары, то есть хромосом 41 и 42, близкие линейные параметры. Они были у первой из них в типах I, II и III, соответственно, $1,8 \pm 0,10$; $1,8 \pm 0,06$ и $1,9 \pm 0,06$ мкм, а у второй — $1,7 \pm 0,12$; $1,7 \pm 0,07$ и $1,7 \pm 0,7$ мкм ($P > 0,999$) и при центромерном индексе выше 44%. Это свидетельствует о близкой степени спирализации хромосом на стадии метафазного формирования в наборах трех типов. Достоверным критерием однородности метафазных хромосом по степени спирализации принято считать близкую длину одной или нескольких пар хромосом [1, 9].

По средним данным морфометрии хромосом построены идиограммы (рис. 1).

На рисунке видно, что в основном расположение хромосом в трех типах по группам соответ-

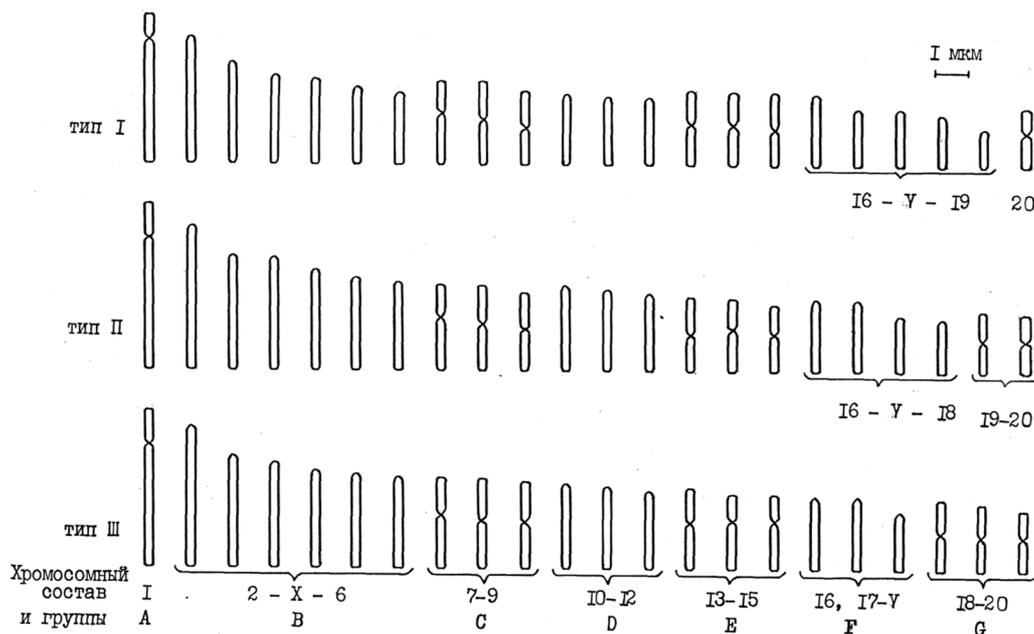


Рис. 1. Идиограммы хромосомных наборов трех типов из клеток костного мозга самцов крыс

ствуется принципу уменьшения их линейных параметров. Они у метацентриков в трех типах варьировали незначительно, их центромерный индекс был выше 40% в среднем. Более мелкие хромосомы наблюдали у субтелоцентриков и большинства акроцентриков в типе I.

В группе G метацентрики были несколько больше рядом расположенной пары акроцентриков из группы F во всех трех типах. В типе I последняя пара хромосом имела размеры также больше и предпоследней пары из группы F. И в этом типе у метацентрических хромосом 7 и 8 пары из группы C отмечали линейные параметры крупнее 6 пары акроцентриков из группы B.

Линейные размеры полиморфных хромосом наблюдали более крупные в типе III, где они метацентрические, и наименьшие в типе I, где они акроцентрические.

Итак, наименьшие линейные параметры хромосом формировались в типе I у субтелоцентрических и большинства акроцентрических хромосом, что происходит за счет наиболее интенсивного процесса спирализации ДНК.

Учитывая, что в хромосомах упаковка ДНК происходит специфически и с учетом активности генов [14], следовательно, через неадекватность линейных параметров и различную морфологию хромосом в разных типах определяется работа генов в специализированных клетках с учетом их дифференцировки в направлении лейкоцитов, эритроцитов и мегакариоцитов.

Мы также изучали структуру хромосом в популяции костного мозга в зависимости от времени воздействия колхицина, который вводили животным в возрасте около месяца массой 42-67 г на 45 минут и 2 часа. В этих опытах использовали по 9 самцов и самок.

В группах самцов одного возраста после введения колхицина одинаковой концентрации на 45 минут и 2 часа образование хромосомных наборов происходило с близкой частотой. В первой группе соотношение I, II и III типов наблюдали в среднем соответственно 24,5; 44,0 и 31,4% ($P > 0,999$) и во второй — 23,8; 45,4 и 30,8% ($P > 0,99$), то есть они были довольно близкими. Аналогичная ответная реакция организма на время воздействия колхицина обнаружена у самок крыс.

Следовательно, явление образования трех типов хромосомных наборов в костном мозге у белых крыс обоих полов не зависело от времени воздействия колхицина в организме. Но его экспозиция влияла на степень спирализации (рис. 2), а также и увеличение накопления количества метафаз.

На рис. 2 представлены хромосомные наборы типа II из клеток костного мозга самки с разной степенью спирализации, в результате чего линейные параметры плеч аутосом в большинстве групп различались, примерно, в 2 раза.

Таким образом, образование трех типов хромосомных наборов в популяции клеток костного мозга происходило у каждой особи и не зависело от времени действия колхицина.

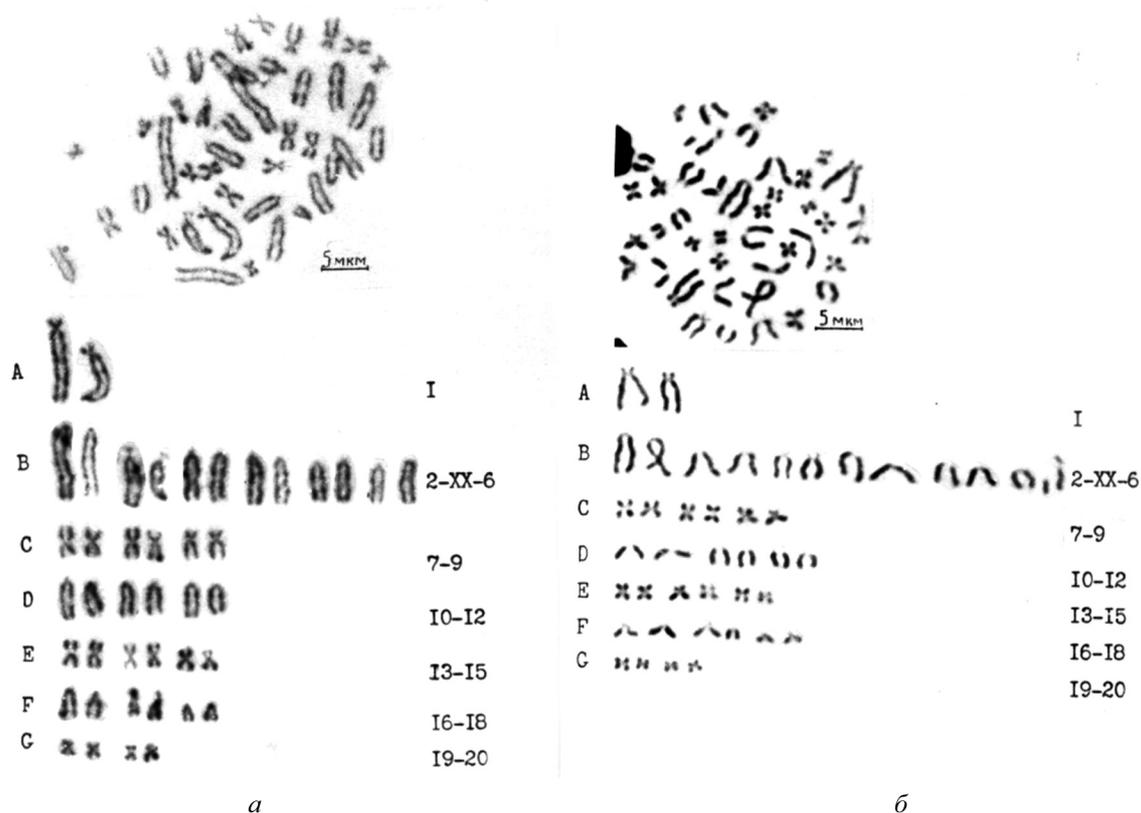


Рис. 2. Хромосомные наборы типа II из клеток костного мозга самки крысы со слабой (а) и сильной (б) степенью спирализации

Кроме того, проводили изучение хромосомных наборов из культуры клеток периферической крови от 4 самцов. Всего визуально изучено 52 хромосомных набора, все они имели структурную организацию по типу II. Для морфометрической идентификации использовали 16 метафазных пластинок.

Структурная организация метафазных хромосом у крыс в наборах из культуры клеток крови и костного мозга была неидентичной. Если из культуры крови, где, как известно, обладают способностью к делению лимфоциты [15], нами выявлен лишь один тип II структурной организации хромосом, то в костном мозге образуются три основных типа хромосомных наборов и три ростка кроветворения [8, 13, 16].

При сравнении морфометрических показателей хромосом из крови и костного мозга не обнаружено существенных различий по центромерному индексу, но их линейные параметры из крови были мельче. Длина в среднем у самой большой и наименьшей хромосомы из культуры крови была $4,2 \pm 0,12$ и $1,1 \pm 0,05$ мкм, а в этом типе из костного мозга составила $5,1 \pm 0,37$ и $1,6 \pm 0,08$ мкм с достоверностью разности между ними, соответственно, при $P > 0,95$ и $P > 0,999$.

Образование трех типов хромосомных наборов в популяции клеток костного мозга и лишь типа II в культуре крови можно объяснить только разными условиями пролиферации, обуславливающими разную укладку ДНК, ее упаковку. Деление клеток в костном мозге осуществляются во внутренней среде организма при большом количестве разных воздействий на уровне гормонов и других биохимических регуляторов. Там идет пролиферация стволовых клеток, затем их дифференцировка с учетом потребностей организма и образование лейкоцитов, эритроцитов и мегакариоцитов, то есть кроветворных клеток с разной программой по активности генов. В условиях культуры крови не реконструированы эти сложные взаимоотношения и воздействия на генетический аппарат клетки, что и обуславливает образование лишь одного типа хромосомных наборов, типа II.

Итак, структурно-функциональные преобразования хромосом и формирование трех типов метафазных хромосомных наборов в популяции клеток костного мозга крыс связаны с процессами реализации генетической программы при дифференцировке трех ростков кроветворения, что нами затем и использовано для разработки нового способа

определения состояния кроветворения [16]. Учитывая, что состояние кроветворения определяет здоровье человека, то данную природную цитогенетическую модель можно использовать для изучения адаптации организма к разным факторам, включая влияние фармпрепаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружено новое явление структурно-функциональных преобразований хромосом в популяции клеток костного мозга у каждой особи крысы, что вносит существенные дополнения в понятия кариотип и полиморфизм хромосом, и расширяет сложившиеся представления в генетике и гематологии. В результате постоянных и повторяющихся преобразований морфологической структуры у двух пар метафазных хромосом выделено три типа хромосомных наборов, отличающихся по числу метацентрических и акроцентрических хромосом. Стабильные изменения в физической организации метафазных хромосом в популяции клеток костного мозга указывают на неизвестный ранее и своеобразный путь реализации генома стволовых клеток в генетические программы специализированных клеток крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлов В. Н., Булатова Н. Ш. Сравнительная цитогенетика и кариосистематика млекопитающих. — М.: Наука, 1983. — 405 с.
2. Standard Karyotype of the Norway rat, *Rattus norvegicus*. Committee for a standardized karyotype of *Rattus norvegicus* // *Cytogenet. and Cell Genet.*, 1973, № 12, P. 155—205.
3. *Hungerford D. A., Nowell T. C. J. Morphol.*, 1963, 113, 275—286.
4. *Yosida T. H., Amano K. Chromosoma*, 1965, № 16, P. 658—667.
5. *Yosida T. H. Chromosoma*, 1973, V.40, № 3, P.285-297.
6. *Бекасова Т. С., Межова О. Н.* Систематика и цитогенетика млекопитающих: Материалы Всесоюзного симпозиума. Москва, 17—19 ноября: Наука, 1975. — С. 15—17.
7. *Kral V. Acta Sci, Nat. Brno*, 1972, V. 6, № 12, P. 1—78.
8. *Чабала Л. И.* Особенности морфологии метафазных хромосом в кроветворных клетках белой крысы / Л. И. Чабала, С. И. Машкин // *Генетика*. — 1990. — Т. 26. — С. 1856—1864.
9. *Орлов В. Н., Чудиновская Г. А., Крюкова Е. П.* Исследование хромосомных наборов млекопитающих. Методическое руководство. — М.: Наука. 1976. — 36 с.
10. *Чабала Л. И.* Способ измерения абсолютных линейных параметров хромосом / Л. И. Чабала // *Космическая биология и авиакосмическая медицина*. — 1988, — №1. — С. 86—87.
11. *Меркурьева Е. К.* Биометрия в селекции и генетике сельскохозяйственных животных. — М.: Колос, 1970. — С. 16—269.
12. *Четыркин Е. М., Калихман И. Л.* Вероятность и статистика. — М.: Финансы и статистика. 1982. — С. 14—31, 78—126.
13. *Чабала Л. И.* Функционально-структурные преобразования хромосом в различных пролиферирующих кроветворных клетках костного мозга белой крысы / Л. И. Чабала // *Космическая биология и авиакосмическая медицина*. 1986. №3. — С. 78—80.
14. *Петрашов В. В.* Глаза и мозг эволюции: Новая теория эволюции организмов. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Прометей, 2006. — С. 20—54.
15. *Захаров А. Ф., Бенюш В. А., Кулешов Н. П., Барановская Л. И.* Хромосомы человека (Атлас) АМН СССР. — М.: Медицина, 1982. С. 9—11.
16. *Чабала Л. И.* Способ определения функционального состояния кроветворения у экспериментальных животных / Л. И. Чабала: А.с. 1697747 СССР. 1991. Бюл. № 48. 1991.

Чабала Лидия Ивановна — научный сотрудник ВГУ, тел.: (473) 2465034

Сливкин Алексей Иванович — профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии ВГУ; e-mail: slivkin@pharm.vsu.ru

Чабала Вадим Анатольевич — Синтезфарм, соискатель; тел.: (473) 2465034

Chabala L. I. — researcher, Voronezh State University, tel.: (473) 2465034

Slivkin A. I. — professor head of the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, Voronezh State University; e-mail: slivkin@pharm.vsu.ru

Chabala V. A. — applicant, Sintezpharm, tel.: (473) 2465034