

УДК 576.312.6

## КУЛЬТУРА КЛЕТОК И КАРИОТИП САХАЛИНСКОГО ОСЕТРА *Acipenser mikadoi*

© 2008 г. **Х. С. Вишнякова, Н. С. Мюге\***, **Д. А. Зеленина\***, **Е. В. Микодина\***,  
**О. А. Ковалева\*\***, **Г. В. Мадан\*\*\***, **Е. Е. Егоров**

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, ул. Вавилова, д. 32;  
электронная почта: yegorov@immb.ru; yegorov58@mail.ru

\*Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО), 107140  
Москва, ул. В. Красносельская, д. 17

\*\* Федеральное государственное учреждение “Центральное управление по рыбохозяйственной экспертизе и  
нормативам по сохранению, воспроизводству водных биологических ресурсов и акклиматизации” (ФГУ  
“ЦУРЭН”), 125009 Москва, Б. Кисловский пер., д. 10

\*\*\*Московский физико-технический институт, 141700 Долгопрудный, Моск. обл., Институтский пер., д. 9  
Поступила в редакцию 18.07.2008 г.

Культура клеток сахалинского осетра *Acipenser mikadoi*, представляющего собой редкий исчезающий вид, была получена из фрагмента грудного плавника с захватом прилежащих мягких тканей. На начальном этапе роста культура состояла из клеток разных типов, среди которых можно было выделить как типичные фибробласты, так и клетки эпителиального происхождения, миофибробласты и др. После примерно пяти пересевов в культуре стали преобладать клетки фибробластной морфологии. Эти клетки росли с постоянной скоростью более года, пройдя за это время около 80 удвоенной популяции. В отсутствие сыворотки клетки переходили в пролиферативный покой ( $G_0$ -покой). При длительном пребывании без замены среды клетки сливались, образуя мышечные волокна длиной несколько сантиметров. Эти волокна могли ветвиться и со временем приобретали поперечную исчерченность. Примерно через 40 дней после возникновения волокна подвергались обратной инволюции: теряли форму, откреплялись от субстрата и погибали. Индукция адипогенной дифференцировки приводила к прекращению пролиферации и появлению в незначительной части клеток липофильных включений. Количество этих включений было ограничено, клетки с включениями имели разнообразную морфологию и не были похожи на адипоциты. Индукция остеогенной дифференцировки приводила к появлению клеток, продуцирующих минерализованный внеклеточный матрикс и к образованию костных узелков. Хромосомный анализ выявил типичный для ряда видов осетров набор хромосом. Вариабельность количества хромосом оказалась очень высокой (в среднем  $247 \pm 33$  при моде в 248 хромосом). С помощью GC- и AT-специфичных флуорохромов обнаружено, что теломерные и центромерные районы всех хромосом обогащены GC-повторами. Обнаружена гетерогенность по распределению AT- и GC-богатых последовательностей между хромосомами. Длинные хромосомы преимущественно окрашиваются AT-специфичным флуорохромом, а мелкие сильнее флуоресцируют при обработке 7-аминоактиномицином D. Несколько мелких хромосом отличаются особенно яркой флуоресценцией при окрашивании этим флуорохромом. Работа представляет собой первый опыт получения культуры клеток сахалинского осетра и анализа его кариотипа.

Сахалинский осетр *Acipenser mikadoi* – редкий вид осетровых, находящийся под угрозой исчезновения. Он включен в Красную книгу Международного союза охраны природы (МСОП). Единственным естественным нерестилищем сахалинского осетра является в настоящее время река Тумнин (Датта), впадающая в Татарский пролив в  $49^{\circ}17'$  СШ и  $140^{\circ}22'$  ВД [1, 2]. В 2001 г. Центробанк России выпустил памятную монету, посвященную сахалинскому осетру (рис. 1).

В начале – середине XX века сахалинский осетр часто встречался по всему Японскому морю, от берегов Китая и Японии и до Приморского и Хабаровского краев Российского Дальнего Востока. В

августе на рыбных рынках Саппоро преобладали молодые сахалинские осетры (35–54 см), а позднее – половозрелые особи длиной 170 см и более, которых вылавливали в крупных японских реках Ишикари и Тишио на о. Хоккайдо [1]. К 1980 г. сахалинский осетр перестал нереститься в реках Японии, однако незрелые особи этого вида продолжают встречаться в морских акваториях, омывающих о. Хоккайдо [1]. Естественный нерест сахалинского осетра в реках Сахалина в настоящее время не отмечен.

Редкие дикие особи и существующее маточное стадо (Охотский лососевый рыбоводный завод, о. Сахалин, пос. Мальки [2]) представляют собой

основу для сохранения генофонда этого вида. Альтернативными способами сохранения генома могут быть криоконсервирование спермы, а также живая культура клеток. Криоконсервация спермы сахалинского осетра была осуществлена в начале 90-х годов XX века [3], образцы замороженной спермы этого вида хранятся в криобанке спермы хозяйственно ценных видов рыб Всероссийского научно-исследовательского института пресноводного рыбного хозяйства (ВНИИПРХ) [4].

Особый интерес к *A. mikadoi* объясняется тем, что по литературным данным его клетки содержат в 2–4 раза больше ДНК, чем у других близкородственных видов [5]. Высказано мнение, что *A. mikadoi* – это гексадекаплоидный или октоплоидный вид, в зависимости от точки зрения на размер диплоидного набора осетровых [6].

В мире уже несколько раз получали культуры клеток осетровых [7, 8]. Культуры клеток рыб можно использовать для тестирования специфических вирусов (например, иридовируса), которые могут наносить существенный вред аквакультуре [9].

Осетры являются не очень удобным объектом разведения. Во-первых, они довольно медленно растут и достигают половой зрелости. Во-вторых, достаточно трудно определить пол рыбы. Генетика пола пока не разработана. Все это приводит к дополнительным сложностям. Однако увеличение антропогенной нагрузки (загрязнение рек, уменьшение возможного ареала обитания и хищнический промысел) обуславливает необходимость развития аквакультуры осетровых. Для уменьшения возможных издержек необходимо глубокое изучение биологии осетра, создание тест-культур клеток, разработка генетики пола.

В данной работе мы ставили цель получить долгоживущую культуру клеток сахалинского осетра и оценить количество хромосом в его клетках. Для подтверждения видовой принадлежности и уточнения филогенетического положения осетра-донора клеток проведено секвенирование проб ДНК, полученных от разных видов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Происхождение исследуемого образца сахалинского осетра.** В 1991 г. специалистами ФГУ “Приморрыбвод” совместно с сотрудниками Центральной лаборатории Главрыбвода от пары выловленных в р. Тумнин диких производителей была получена оплодотворенная икра [10, 11]. В том же году развивающиеся эмбрионы были перевезены на Охотский лососевый рыбоводный завод (о. Сахалин, пос. Мальки), где дали начало существующему ныне маточному стаду [2]. В 2005 г. в условиях Охотского рыбоводного завода (о. Сахалин) от дикой самки (РНКЭГМ# Mik21), также вылов-



Рис. 1. Монета с изображением сахалинского осетра.

ленной в р. Тумнин, и 14-летнего самца из маточного стада было вновь получено потомство [12]. Для получения настоящей культуры клеток сахалинского осетра использовали ткани от одной особи в возрасте 1 г. С этой целью один из годовиков, выращенных на Охотском заводе, летом 2006 г. был доставлен в аквариальную ВНИРО (г. Москва) и впоследствии передан в ИМБ РАН.

**Секвенирование митохондриальной ДНК и построение филогенетического дерева.** Анализировали образцы тканей, полученные от различных видов осетровых (таблица). Выделяли ДНК стандартным солевым методом с лизированием протеиназой K [13]. Полноразмерные последовательности контрольного региона (D-loop) митохондриальной ДНК (мтДНК) амплифицировали с использованием праймеров LproF (5'-AACTCTCACCCCTAGTCCCAAAG-3') и DL651 (5'-ATCTTAACATCTTCAGTG-3'), комплементарным участкам, граничащим с контрольным регионом генов транспортных РНК (tPro и tPhe). Амплификацию проводили в стандартных условиях при температуре отжига 52°C [14]. Длина продукта варьировала от 950 до 1280 п.н. в зависимости от числа присутствующих в гаплотипе 82-нуклеотидных повторов, а также от видовой принадлежности образца.

Секвенирование проводили с тех же праймеров, что и ПЦР, на автоматическом секвенаторе ABI 3100 с использованием набора для секвенирования BigDye v.1.1. Часть особей имела полиморфизм по числу 82-нуклеотидных повторов на 3'-участке контрольного региона (граничащего с tРНК пролина). Чтобы избежать наложения чтения нуклеотидной последовательности с матрицы, имеющей разное число повторов, применяли праймер ANR3 (5'-CATACCATAATGTTTCATSTACC-3'), комплементарный участку непосредственно перед повторяющимся фрагментом.

Выравнивание и сборку контигов проводили путем анализа хроматограмм в программе SeqMap, множественное выравнивание – в программе MegAlign, праймеры разрабатывали с помощью

Источники генетического материала и последовательностей контрольного региона митохондриальной ДНК (мтДНК) (Genbank) для построения филогенетического дерева

Видовая принадлежность осетровых	№ из коллекции Genbank http://www.ncbi.nlm.nih.gov	№ из коллекции РНКЭГМ (ВНИРО)	Происхождение биологического материала
Сахалинский осетр <i>A. mikadoi</i>		Mik07-16 (2003 г.) Mik22-24 (2006 г.) Mik17-18 (2003 г.) Mik19-21 (2005 г.)	Охотский лососевый рыболовный завод (Охотский ЛРЗ) р. Тумнин
Амурский осетр <i>A. schrenckii</i>		SCH07-11	р. Амур
Калуга <i>Huso dauricus</i>		DAU42, 43, 60, 63.12, 61, 05	р. Амур
Сибирский осетр <i>A. baeri</i>		BAE158	р. Обь
Русский осетр <i>A. gueldenstaedti</i>		GUE2183	Каспийское море
Зеленый осетр <i>A. medirostris</i>	U30728 (Med Amer1) L01509 (Med Amer2) AF184106 (Med Amer3)		Север американского побережья Тихого океана
Зеленый осетр <i>A. medirostris*</i>	AF362130 (Med Asian)		Азиатское побережье Тихого океана
Белый осетр <i>A. transmontanus</i>	X54348 (Transm54) AF184108 (Transm18) NC004743 (Transm00)		Реки западного побережья северной Америки

\* Genbank называет сахалинского осетра зеленым согласно номенклатуре, принятой СИТЕС (Конвенция по международной торговле вымирающими видами дикой фауны и флоры), связанной с давними спорами, является ли сахалинский осетр самостоятельным видом либо подвидом зеленого (*medirostris*) осетра.

программы PrimerSelect (все программы входят в пакет DNASTar, Lasergene Inc).

**Получение культуры клеток.** Тело осетра было помещено в ламинарный шкаф с подачей стерильного воздуха. Грудной плавник осетра и окружающие ткани 3 раза протирали раствором 70% этанола, после чего отрезали грудной плавник с незначительным захватом мягких тканей и переносили в чашку Петри со стерильной средой DMEM (“ПанЭко”, Россия), содержащий 200 ед/мл гентамицина. После этого, из соображений обеспечения стерильности, с помощью ножниц было удалено примерно 5 мм края плавника (плавник имел в длину несколько сантиметров). Ткани плавника измельчили ножницами и поместили в культуральную среду следующего состава: среда DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) (“ПанЭко”, Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“HyClone”, США), 25 мМ HEPES (“Sigma”, США) и 40 ед/мл гентамицина. Клетки культивировали при 24–25°C в герметически закрытых культуральных флаконах (“Costar”, США). Пересев клеток проводили по достижении ими монокультуры с помощью обычной трипсин-версеновой обработки. Клетки для хранения замораживали в

присутствии 10% диметилсульфоксида по обычной методике.

**Получение препаратов хромосом и кариотип.** Клетки снимали с субстрата с помощью обработки трипсином/версеном и переносили в гипотонический раствор (0,06 М KCl) на 1 ч. После этого их фиксировали смесью метанол/уксусная кислота (3 : 1) и раскапывали на холодные влажные предметные стекла. Препараты окрашивали либо монохромно с помощью DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола), либо двумя флуорохромами DAPI и 7-аминоактиномицином Д.

Позиции метафазных пластинок на стеклах определяли с помощью фазово-контрастного микроскопа. После этого с помощью люминесцентного микроскопа Olympus BX61 (Япония), оснащенного 12-битной черно-белой цифровой камерой CoolSnap (“Roper Scientific”, США), и с использованием иммерсионного объектива 60x 1,4 NA получали изображения, которые совмещали (в случае двух красителей) и контрастировали, используя программу Image J.

Для кариотипирования были выбраны четыре монохромные метафазные пластинки с наиболее ясной морфологией хромосом и малым количе-

ством наложений. Хромосомы были разложены в основном по размеру. Исключение составили крупные акроцентрические хромосомы, которые мы поместили в отдельной строке, как это часто делают при раскладке осетровых хромосом (<http://web.unife.it/progetti/geneweb/sturgeon.html>). Обнаружив совпадение наиболее крупных 64 хромосом в четырех пластинках, мы выбрали морфологически лучшую раскладку и взяли ее в качестве кариотипа.

**Изображения клеток.** Культуру наблюдали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Diavert ("Nikon", Япония). Изображения фиксировали, используя цифровую камеру Nikon D70. Цифровое усиление контраста проводили с помощью программы Image J.

**Митотический индекс.** Клетки наблюдали в фазово-контрастный микроскоп Diavert ("Nikon", Япония) со стократным увеличением (окуляры и объектив  $\times 10$ ). Подсчитывали количество митозов и общее количество клеток в 30 полях зрения (на каждую экспериментальную точку приходилось по три флакона с клетками (T25 "Nunc", Дания), в каждом из них исследовали по 10 полей, что при наблюдаемой клеточной плотности равносильно подсчету около 3000 клеток для каждой точки. Опыт повторяли не менее 3 раз.

**Индукция дифференцировок.** Для индукции адипогенной дифференцировки клетки в субконфлуентном состоянии переводили в адипогенную среду следующего состава. Среда DMEM с высоким содержанием глюкозы, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,5 мМ изобутил-метилксантина, 1 мкМ дексаметазона, 10 мкМ инсулина. Среду меняли через каждые 3–4 дня. Препараты фиксировали через 3 нед. Для индукции остеогенной дифференцировки субконфлуентные клетки переводили в среду DMEM с добавлениями 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкМ аскорбат-2-фосфата, 10 мМ  $\beta$ -глицерофосфата и 0,1 мкМ дексаметазона (все реактивы "Sigma", США). Среду меняли каждые 3–4 дня. Фиксацию проводили через 3 нед.

**Гистохимия.** Для выявления липидов использовали окраску суданом 4. Клетки фиксировали раствором 3,7% формалина в течение 30 мин при комнатной температуре. Окрашивание вели насыщенным раствором судана 4 в изопропиловом спирте в течение 1 ч при комнатной температуре. Образование минеральных комплексов при остеогенной дифференцировке выявляли окрашиванием ализариновым красным. Клетки фиксировали раствором 3,7% формалина в течение 30 мин при комнатной температуре, окрашивали 1% раствором ализаринового красного в течение 10 мин при комнатной температуре.

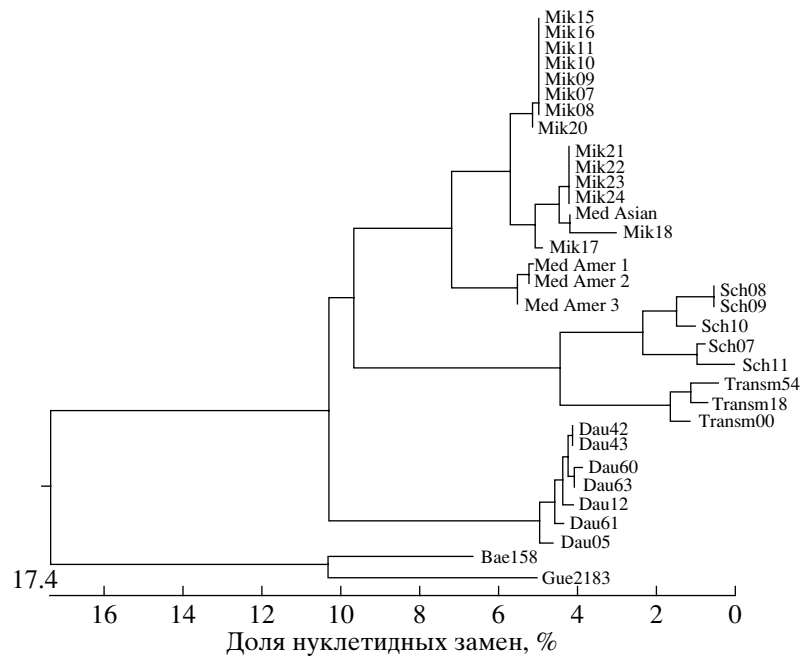
**Проточная цитофлуориметрия.** Клетки переводили в суспензию с помощью смеси трип-

син/версен (1 : 1) ("ПанЭко", РФ), переносили в 15-см центрифужные пробирки ("Corning", США) в 5 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) ("ПанЭко") и осаждали в течение 6 мин при 400g. Супернатант удаляли, клетки тщательно ресуспендировали при помощи Пастеровской пипетки в 0,5 мл PBS, такой же пипеткой суспензию вводили в 4,5 мл 70% этанола при  $-20^{\circ}\text{C}$  для фиксации. Фиксированные образцы хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  в центрифужных пробирках.

Фиксированные в этаноле клетки осаждали в течение 6 мин при 400g, фиксатор удаляли, клетки ресуспендировали в 5 мл PBS и повторно осаждали в тех же условиях. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 1 мл окрашивающего раствора, содержащего 20 мкг/мл иодистого пропидия ("Fluka", США), 0,1% тритон X-100 ("Merck", Германия), 0,2 мг/мл РНК-азы А, свободной от ДНКаз, в PBS. Суспензию помещали в 1,8-мл пробирки и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Окрашенные клетки осаждали в микроцентрифуге (4 мин при 400g) и ресуспендировали в 1 мл PBS. Перед работой клеточную суспензию просеивали через сетку с порами диаметром 100 мкм.

Исследовали распределения флуоресценции пропидия на приборе COULTER EPICS XL (канал флуоресценции FL3, напряжение на ФЭУ 667 В, усиление 6,5, дополнительная логическая обработка для дискриминации клеточных агрегатов, счет до 10000 событий). Полученные результаты обрабатывали при помощи программного обеспечения Summit Offline.

**Иммуногистохимия.** Для выявления доли клеток, синтезирующих ДНК, в среду культивирования добавляли бромдезоксисуридин (BrdU, "Sigma", США) до конечной концентрации 12 мкМ и выдерживали 1 ч. Клетки фиксировали 3,7% формальдегидом в течение 10 мин, предварительно трехкратно промывая PBS. Далее покровные стекла с клетками обрабатывали смесью 4 М HCl/1% тритон X-100 в течение 10 мин, после чего инкубировали в смеси, содержащей 10% бычьей сыворотки ("HyClone"), 0,5% тритона X-100, 0,05% Tween-20 ("Ferak", Германия) и 1% бычьего сывороточного альбумина ("Calbiochem", США). Клетки обрабатывали антителами мыши против BrdU ("Boehringer Mannheim", Германия) в разведении 1 : 400 в течение 1 ч при комнатной температуре, затем вторыми антителами козы, конъюгированными с  $\text{Cu}3$  ("Amersham Biosc.", Швеция), в разведении 1 : 1500 в течение 1 ч при комнатной температуре. Препараты контрастировали с помощью флуорохрома Hoechst 33258 ("Merck", Германия) в концентрации 1 мкг/мл в течение 5 мин. За каждой стадией следовала трехкратная промывка в течение 5 мин в PBS, содержащем 0,1% Nonidet P-40 ("Sigma"). Препараты заключали в смеси глицерин–PBS (9 : 1) с добав-



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево осетров (NJ), построенное на основании анализа нуклеотидных замен в контрольном регионе мтДНК, выделенной из биологического материала, а также из нуклеотидных последовательностей ДНК, представленных в Genbank. Обозначения см. в таблице.

лением 30 мкМ сульфита натрия для уменьшения выцветания.

Готовые препараты наблюдали с помощью люминесцентного микроскопа Olympus BX61 (Япония), регистрировали клетки с мечеными ядрами и общее количество клеток. На каждую точку просчитывали по 30 полей зрения. Опыт повторяли не менее 3 раз.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Видовая идентификация осетра – источника культуры клеток.** На основании филогенетического анализа контрольного региона мтДНК видовая принадлежность осетра (Mik22), привезенного с Охотского ЛРЗ и послужившего донором для создания культуры клеток в данном исследовании, однозначно определяется как *A. mikadoi* (рис. 2). Кроме того, выяснилось, что мтДНК донорной особи и двух других особей (Mik23-24), также полученных в 2005 г. на Охотском ЛРЗ, полностью совпадает с мтДНК отловленной на р. Тумнин (Mik21) самки, чью икру использовали для производства этой молоди.

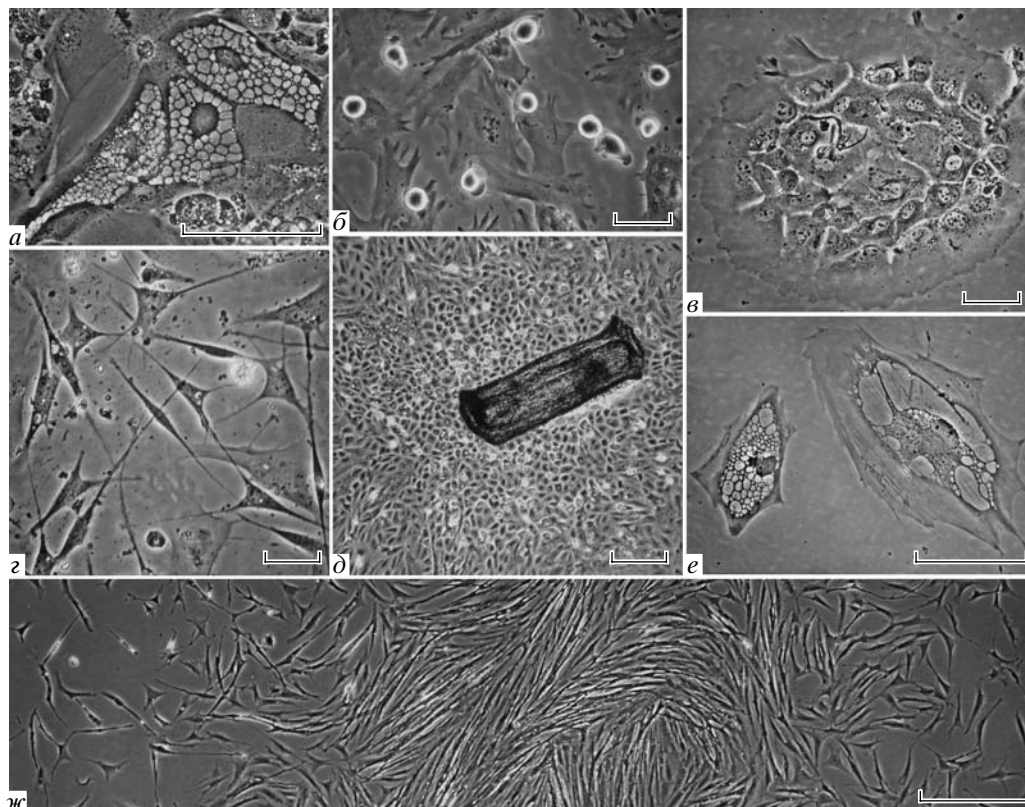
**Разнообразие клеточных типов на начальном этапе развития первичной культуры.** Первоначальная культура состояла из очень разных клеток значительного размера. Сохранившиеся фрагменты ткани долгое время продолжали генерировать клетки разных типов, представленные на рис. 3. В общем клетки были весьма схожи с клетками че-

ловека или мыши, хотя некоторые обладали довольно необычной морфологией (рис. 3e). Цитоплазма вокруг ядра соединялась с цитоплазмой на периферии клетки посредством узких канальцев. Большинство клеток образовывали скопления вокруг фрагментов ткани (рис. 3д), но встречались и клетки, образующие независимые колонии, состоящие в основном из фибробластоподобных клеток. Также встречались колонии из клеток, напоминающих миобласты (рис. 3ж), распознаваемые в основном по взаимному расположению клеток, и эпителиоидные колонии (рис. 3в).

После нескольких пересевов многообразие клеток резко сократилось. В культуре стали преобладать фибробластоподобные клетки.

**Проллиферативный потенциал клеток.** Клетки росли стабильно в течение года. За это время не было замечено каких-либо замедлений роста. При более частом пересеве скорость роста клеток возрастала. Это связано с тем, что часть клеток при увеличении клеточной плотности подвергалась контактному торможению, что останавливало рост (происходило уменьшение доли митотических клеток). За все время наблюдения клетки прошли около 80 удвоений популяции (рис. 4). Клетки неоднократно замораживали на различных стадиях роста. После размораживания они восстанавливали все свои свойства и продолжали расти.

**Митотические деления клеток *A. mikadoi*.** Удивительным оказалось удобство, с которым



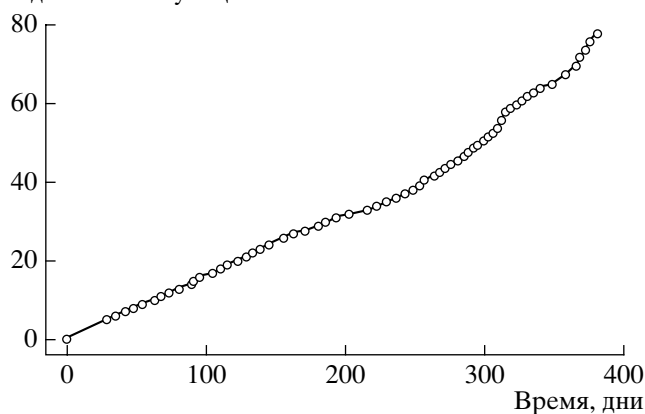
**Рис. 3.** Многообразие клеточных типов в первичной культуре клеток *A. mikadoi*. *a* - Вакуолярная дегенерация клеток; *б* - суспензионные клетки на фидерном слое распластанных клеток; *в* - небольшая колония эпителиоидных клеток; *г* - клетки, напоминающие фиброциты рыхлой соединительной ткани; *д* - выползание фибробластоподобных клеток из костных фрагментов луча плавника (*bone ray*); *е* - клетки непонятного происхождения; *ж* - колония миобластов. Масштабные полоски: *a* и *е* - 100 мкм, *б*, *в* и *г* - 50 мкм, *д* - 250 мкм, *ж* - 500 мкм. Фазовый контраст, цифровое контрастирование.

можно было наблюдать митотическое деление клеток. Процесс наблюдения нисколько не тормозил все стадии митоза (рис. 5г, цветная вкладка). Размер клеток позволял рассмотреть процесс расхождения хромосом.

#### **Проллиферативный покой клеток *A. mikadoi*.**

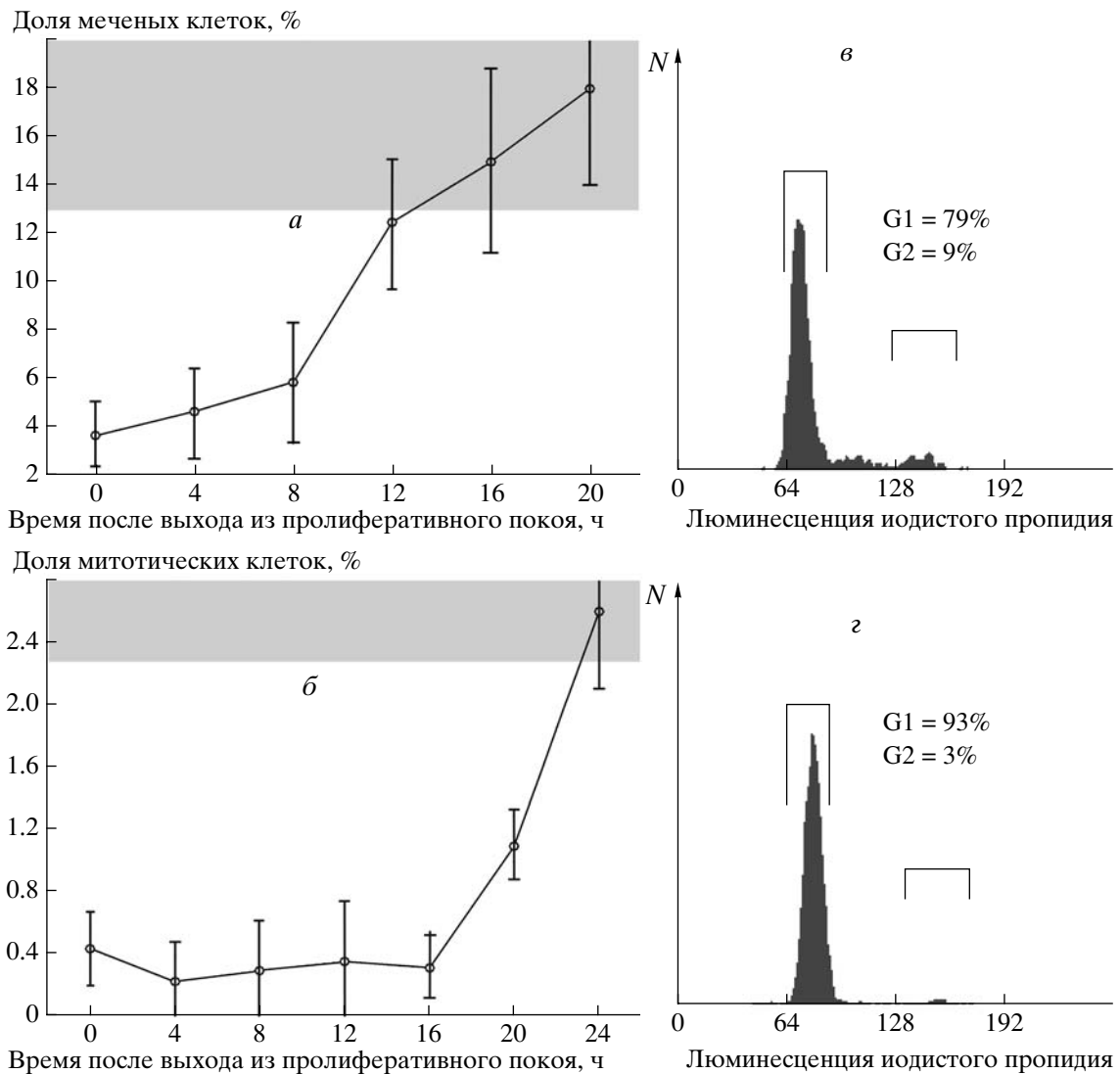
Были проведены эксперименты по изучению действия на клетки сывороточного голодания. Для этого клетки переводили в состояние пролиферативного покоя с помощью трехдневной инкубации в среде с низким (0.2%) содержанием сыворотки. После повторной стимуляции с помощью добавления 10% сыворотки наблюдали процесс возвращения клеток в цикл. Анализировали время начала репликации ДНК (по доле клеток, включающих BrdU) и время появления митотических клеток. Оказалось, что после трехдневного сывороточного голодания клетки переходят в практически неделящееся состояние; доля меченых клеток составляет несколько процентов, доля митотических - доли процента (рис. 6а,б). Через несколько часов после стимуляции доля меченых клеток начинает возрастать и, примерно к 16 ч достигает уровня, характерного для растущей культуры

Удвоения популяции



**Рис. 4.** Кривая роста клеток *A. mikadoi*.

(рис. 6а). Возрастание доли митотических клеток сильно запаздывает: реальное повышение происходит после 16 ч (рис. 6б). Таким образом, клетки сначала синтезируют ДНК, а потом вступают в митоз, что свидетельствует об их остановке в периоде



**Рис. 6.** Способность клеток сахалинского осетра переходить в состояние пролиферативного покоя  $G_0$ . На *а* и *б* величина разбросов составляет  $\pm 2$  стандартных отклонения, серым показаны границы параметров контрольной (растущей) культуры.

$G_1$  клеточного цикла в процессе сывороточного голодания.

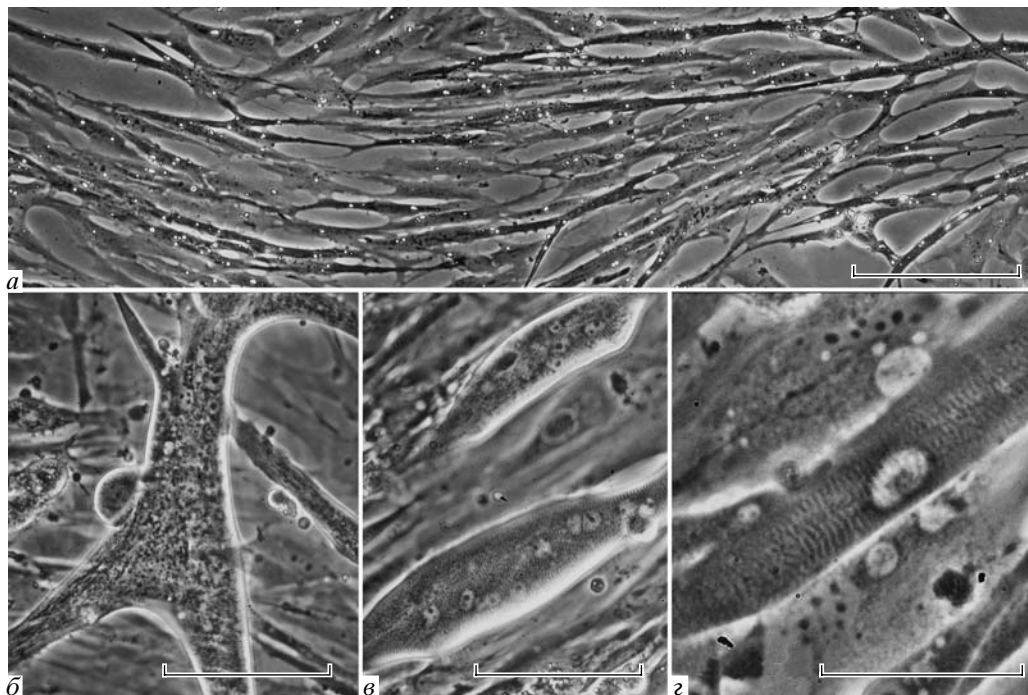
Анализ содержания ДНК в клетках с помощью проточного цитофлуориметра также показал, что при сывороточном голодании клетки накапливаются в периоде  $G_1$  (рис. 6*в,г*). Доля клеток, содержащих диплоидное (для этой культуры) количество ДНК, возрастала с 79 до 93%, а доля клеток, соответствующая периоду  $G_2$ , падала с 9 до 3%.

Таким образом, мы показали, что в условиях пониженного содержания сыворотки клетки *A. mikadoi* переходят в состояние  $G_0$ -покоя.

#### **Спонтанная мышечная дифференцировка.**

Обнаружено, что полученные нами клетки обладают способностью спонтанно дифференцироваться в поперечно-полосатые мышечные волок-

на. Если не производить пересевов и смены среды, то примерно через неделю можно заметить образование характерного клеточного рисунка (рис. 7*а*). Клетки выстраиваются в линии и начинают сливаться друг с другом. Через 10 дней образуются вполне различимые волокна. Такие волокна местами образуют утолщения, в которых можно увидеть множественные ядра (рис. 7*в*). Волокна могут разветвляться (рис. 7*б*). Примерно через 2 нед в волокнах появляется характерная поперечная исчерченность (рис. 7*г*). Спонтанной сократительной активности мы не наблюдали. В процессе мышечной дифференцировки принимала участие довольно значительная (десятки процентов) доля клеток, однако эта доля никогда не превышала 50%. Процесс одинаково хорошо шел как в среде DMEM, так и в среде DMEM/F12. Клетки не теряли способности к



**Рис. 7.** Спонтанная мышечная дифференцировка в культуре клеток *A. mikadoi*. *a* – Начальные стадии выстраивания и слияния клеток; *б* – разветвленное мышечное волокно; *в* – многоядерное мышечное волокно; *г* – поперечная исчерченность мышечного волокна. Масштабные полоски: *a* – *в* – 100 мкм, *г* – 50 мкм. Фазовый контраст, цифровое контрастирование.

мышечной дифференцировке, по крайней мере, в течение 50 удвоений популяции.

После того, как в части наиболее крупных волокон возникла поперечная исчерченность, процесс миогенеза останавливался. Просуществовав примерно 40 дней, мышечные волокна претерпевали обратную инволюцию. Они теряли форму, исчерченность становилась беспорядочной, и волокна превращались в округлые образования, содержащие много ядер (рис. 7в).

**Остеогенная и адипогенная дифференцировка.** В целях дальнейшего изучения культуры клеток мы проверили их способность к остеогенной и адипогенной дифференцировке. Использовали стандартные способы индукции этих дифференцировок, применяемые для клеток человека.

Индукция адипогенной дифференцировки не привела к появлению типичных адипоцитов. Примерно через 2 нед в небольшой доле клеток появились липофильные включения (рис. 5д, цветная вклейка). Однако эти включения не занимали сколько-нибудь значительного объема, не росли и не сливались.

Индукция остеогенной дифференцировки прошла более удачно. Клетки перестали делиться и укрупнились (рис. 8). Существенная доля клеток (но значительно меньше половины) начала секретировать минерализующийся матрикс (рис. 5е), в

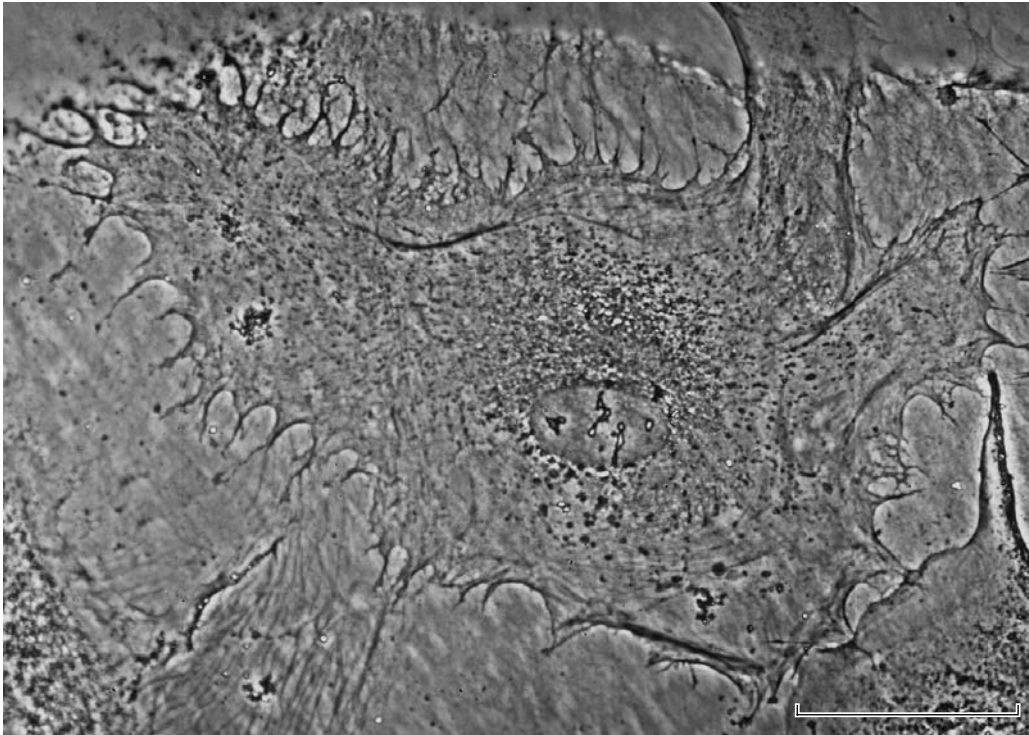
ряде случаев образовались типичные костные узелки (рис. 5ж).

**Изучение кариотипа.** Анализ препаратов хромосом выявил типичный для всех осетров набор хромосом. Хромосомы сильно различаются по размеру, однако образуют плавное непрерывное распределение: от самых больших до очень маленьких (рис. 9). Среди хромосом преобладают метацентрики, но имеются и субметацентрики, и акроцентрические хромосомы. Примерно половина набора представлена очень мелкими хромосомами. Так же как и у других видов осетров, в наборе имеются несколько довольно крупных акроцентрических хромосом.

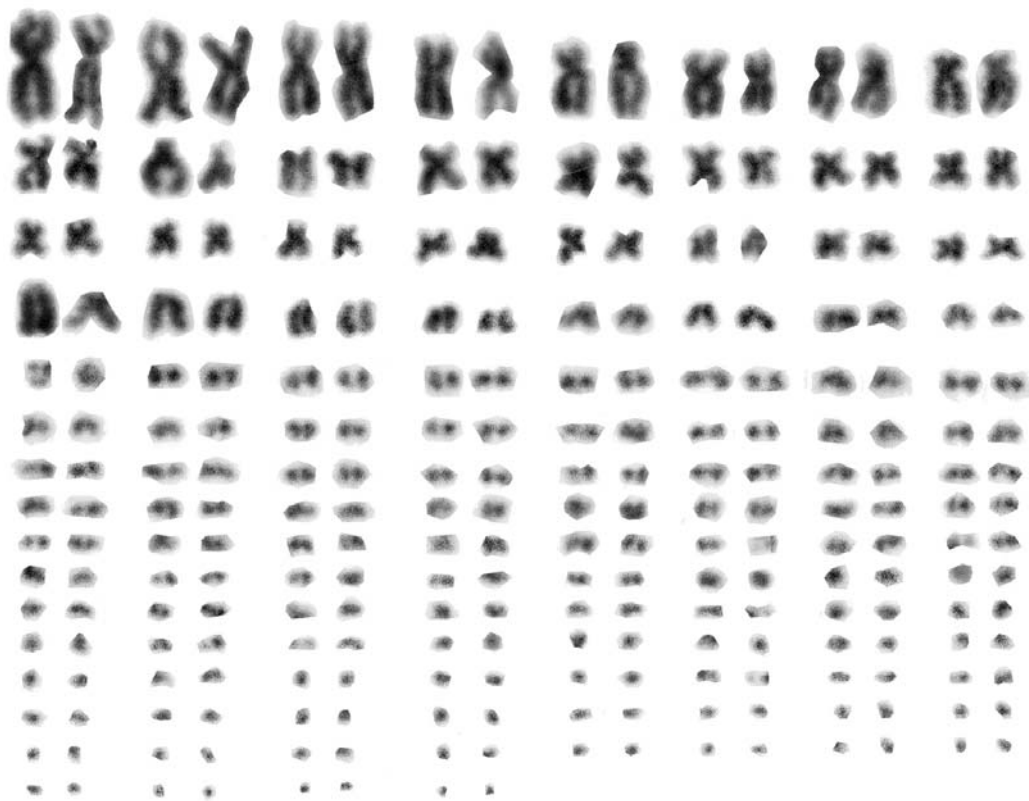
При подсчете количества хромосом проанализировано несколько десятков метафазных пластинок. Значительная часть из них оказалась неполной (по подсчету крупных хромосом). Среди остальных (24 пластинки) среднее число хромосом составило 247 при стандартном отклонении 16,6 (рис. 10). Половина всех пластинок расположилась в границах 234–255 хромосом, мода распределения оказалась равной 248 хромосом (три пластинки). Таким образом, мы полагаем, что наиболее верной оценкой числа хромосом является 248.

Окрашивание хромосом красителями, специфичными для АТ- и GC-богатых последовательностей, показало, что практически во всех хромосомах центромерные и особенно теломерные райо-





**Рис. 8.** Остеобластоподобная клетка *A. mikadoi*, полученная через 3 нед остеогенной дифференцировки. Масштабная полоска – 100 мкм. Фазовый контраст, цифровое контрастирование.



**Рис. 9.** Кариотип *A. mikadoi*. 248 хромосом.

ны обогащены GC-богатыми последовательностями (рис. 5а,б,в; цветная вклейка). Также обнаружена интересная тенденция: все крупные хромосомы более богаты AT-последовательностями, чем мелкие. Среди мелких хромосом, несколько пар содержат особенно много GC-богатых последовательностей.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Сахалинский и зеленый осетры эволюционно удалены друг от друга.** Зеленый осетр был впервые описан Айерсом в 1854 г. как *Acipenser medirostris* [15]. Примерно 40 лет спустя в 1892 г. Хилгендорф описал очень похожего азиатского осетра, пойманного в Японии, и присвоил ему имя *A. mikadoi* [16]. Зеленый и сахалинский осетры морфологически очень сходны, ареалы их обитания пересекаются, кроме того, они имеют одинаковых паразитов. Поэтому если в 1904 г. Шмидт называл пойманного на Сахалине осетра *A. mikadoi*, то под влиянием многочисленной критики к 1950 г. он переменял свое мнение, согласился с тем, что азиатская форма является подвидом зеленого осетра, и ввел термин *A. medirostris mikadoi*. Таким образом, на данный момент в литературе имеются три термина для обозначения сахалинского осетра [17].

В последние десятилетия с помощью молекулярных маркеров [5, 6, 18, 19] получены данные о существенных различиях между зеленым и сахалинским осетрами, позволяющие отнести их к разным видам, как это было принято в начале XX века. Анализ изменчивости мтДНК, проведенный нами, позволяет сделать вывод, что американская популяция зеленого осетра (*A. medirostris*) и дальневосточная популяция сахалинского осетра (*A. mikadoi*) формируют два четких кластера с хорошей бутстреп-поддержкой (разновидность оценки статистической достоверности топологии кладограмм), и время их дивергенции сопоставимо со временем формирования другой пары видов тихоокеанской клады (ветви на филогенетическом дереве) осетровых – белого осетра (*A. transmontanus*) на западном побережье США и дальневосточного амурского осетра (*A. schrenkii*) (рис. 2).

Наши данные также показывают, что все семь проанализированных особей сахалинского осетра, содержащихся на Охотском ЛРЗ в 2003 г., были потомками одной самки и не представляют генетического разнообразия вида. Для успешного восстановления вида должны быть предприняты значительные усилия по расширению генетического разнообразия.

**Культура клеток.** Большой удачей нашей работы оказалось то, что клетки сахалинского осетра способны расти в стандартных средах, разработанных для культивирования клеток млекопитаю-

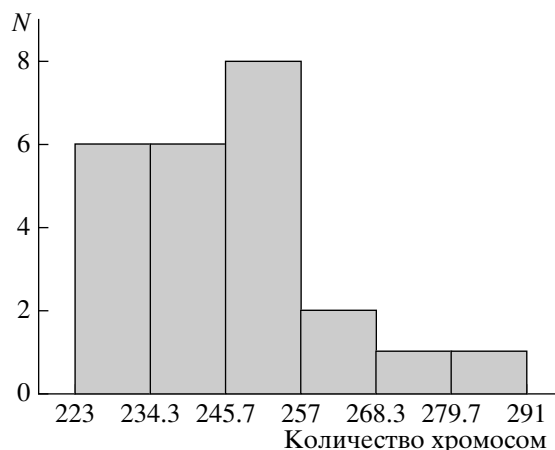


Рис. 10. Гистограмма распределения числа хромосом в метафазных пластинках (N). Общее число пластинок 24.

щих. Добавление в среду буфера HEPES в наших опытах было обусловлено отсутствием CO<sub>2</sub>-инкубатора, настроенного на низкую (по сравнению с клетками теплокровных) температуру.

Литературные данные показывают, что клетки рыб и, в частности осетров, можно эффективно выращивать на самых разнообразных средах. В работе [7] в краткосрочных экспериментах (10 дней) на культуре белого осетра сравнили четыре среды: MEM, L-15, M199 и RPMI. Среда M199 оказалась лучшей, остальные три среды давали примерно одинаковые результаты. В работе [20] на культуре клеток золотого барбуса (*Tor putitora*) сравнили среды MEM, RPMI, L-15 и GIS (среда Грейса) и отдали предпочтение среде L-15. Стандартная среда для эмбриональных стволовых клеток рыб основана на смеси DMEM и L-15 [21].

Культуры клеток различных видов осетров известны с 1985 г. [7–9, 22–24]. Наши данные во многом совпадают с данными работы [7], в которой получена культура клеток белого осетра и подсчитаны хромосомы. В этой работе, как и в нашей, клетки культивировали при 25°C. Как и в нашей работе, примерно после пятого пассажа исчезло изначально присутствующее в культуре разнообразие клеточных типов. Это обстоятельство характерно для многих первичных культур, поскольку клетки разных типов требуют для роста различные условия, которые унифицируются в культуре. Известно, например, что эпителиальные клетки в организме растут на базальной мембране, являющейся продуктом клеток другого типа. Поэтому для длительного роста эпителиальных клеток в культуре требуются фибробласты – продуценты белков базальной мембраны [25].

Фибробластная морфология не является исключительным признаком фибробластов, но характерна для многих клеток-предшественников,

включая предшественники миобластов, остеобластов, хондробластов, а также для их общих предшественников – мезенхимальных стволовых клеток.

Опыты показали, что полученная нами культура содержит, как минимум, предшественники миобластов и остеобластов. Возможно, что эти предшественники составляют различные субпопуляции клеток. С другой стороны, вероятно, что в культуре присутствует небольшая популяция стволовых клеток. Проведенные опыты не позволяют различить эти возможности, однако, поскольку способность нашей культуры к различным дифференцировкам сохранялась на протяжении десятикратного удвоения, можно предположить, что в ней имеются клетки, способные к различным дифференцировкам, т.е. стволовые. Аналогичную ситуацию, когда культура клеток постоянно генерирует по-разному дифференцированные клетки, мы наблюдали при получении бессмертной культуры нейральных стволовых клеток человека [26]. На протяжении 15 мес. в культуре постоянно появлялись различные неделящиеся дифференцированные клетки, при этом соотношение нейральной и глиальных дифференцировок было постоянным.

Учитывая, что клетки нашей культуры прошли свыше 80 удвоений популяции, не теряя скорости пролиферации, можно предположить, что культура этих клеток является бессмертной. Аналогичное поведение описано для культуры клеток золотой рыбки (*Carassius auratus*) [27]. В отличие от клеток млекопитающих, чей рост характеризуется старением и кризисом, клетки золотой рыбки растут в течение 22 мес без потери скорости.

Способность клеток нашей культуры к мышечной дифференцировке обусловлена, вероятно, тем, что первичный эксплант содержал мышечные волокна. Рутинную культуру клеток рыб обычно приготавливают из ткани плавников. Удобство такого метода состоит в том, что после отрезания части плавника рыба остается живой, и возможно проведение повторных разнообразных исследований. В нашем случае брали ткань целого плавника с захватом мышц.

Взрослый осетр содержит ряд костных элементов, представленных в первую очередь “жучками” (костные бляшки вдоль тела) и частью черепа. Поэтому не удивительно, что осетровые клетки оказались способными к костной дифференцировке. Наш опыт работы с клетками человека и мыши показывает, что очень многие культуры клеток способны к такой дифференцировке [28]. Костную дифференцировку можно назвать самой “легкой”; спонтанная костная дифференцировка стволовых клеток является одним из факторов риска при клеточной терапии.

**Карюотип.** Клетки *A. mikadoi* имеют хромосомный набор, очень схожий с наборами других мно-

гохромосомных видов осетров. Хромосомы по своим размерам образуют непрерывный ряд от довольно крупных – порядка 10 мкм на препаратах (рис. 9), до самых мелких – длиной около 1 мкм. Большинство хромосом метацентрические, есть небольшое количество субметацентриков и характерный для осетров набор из нескольких акроцентрических хромосом довольно большого размера. Большая часть генома представлена очень мелкими хромосомами, структуру которых определить довольно трудно.

Есть несколько параметров, объединяющих кариотипы осетровых. Это, прежде всего, большое количество хромосом – от 116 у *A. nudiventris* [29] до 372 у *A. brevirostrum* [30]. По количеству хромосом осетров можно разделить на три группы: с содержанием около 120 хромосом [31–36], около 250 хромосом [37–42] и один вид, возможно, содержащий 372 хромосомы [30]. По нашим данным клетки *A. mikadoi* содержат 248 хромосом, что очень близко к зеленому осетру – 249 хромосом [38], сибирскому осетру – 246 хромосом [37], совпадает с одной из оценок количества хромосом у белого осетра (248 хромосом) [37], немного меньше, чем у персидского (258) [39] и русского осетров (258) [40].

Вторая особенность кариотипа осетров – повышенная вариабельность числа хромосом. Количество хромосом варьирует как внутри любого препарата, так и у разных особей, выловленных одновременно и в одном месте [43, 44]. Причины этой вариабельности неизвестны, но ясно, что это не артефакты приготовления хромосомных препаратов. Например, по оценке разных авторов, количество хромосом у белого осетра составляет от  $240 \pm 8$  до  $271 \pm 2.5$  [7, 22, 23, 37, 43]. Для подсчета числа хромосом в большинстве случаев используют препараты крови. У нас не было этой возможности, и мы работали на культуре клеток после ее довольно долгого культивирования (на уровне между 20 и 80 удвоением популяции). Возможно, что высокая вариабельность числа хромосом, полученная нами  $247 \pm 33$  (для вероятности 95%), отражает повышенную вариабельность числа хромосом именно в культуре клеток.

Применяя одновременное окрашивание АТ- и GС-специфичными красителями, нам удалось установить интересную закономерность, характерную не только для хромосом осетра, но и для хромосом человека и даже растений [45]. Теломерные и центромерные районы хромосом обогащены GС-последовательностями (рис. 5а,б,в; цветная вклейка). Подобное распределение было ожидаемым. Гораздо более интересно, что большинство крупных хромосом *A. mikadoi* сильнее флуоресцируют при окрашивании АТ-специфическим флуорохромом DAPI, а мелкие хромосомы сильнее флуоресцируют при окрашивании GС-специфиче-

ским красителем 7-аминоактиномицином D. При этом несколько мелких хромосом обладают особенно яркой флуоресценцией. Можно предположить, что ряд мелких хромосом осетров имеют прежде всего регуляторные функции, связанные с процессами онтогенеза, а распределение функций между хромосомами отражает некий далекий этап эволюции карิโอотипов.

Нерешенным в рамках представленной работы остается вопрос о том, почему при измерении количества ДНК у сахалинского осетра в 1993 г. [5] были получены цифры, соответствующие 500 хромосомам. Одно из возможных объяснений состоит в том, что осетр, клетки которого измеряли в 1993 г. обладал более высокой степенью плоидности. Альтернативное не менее парадоксальное объяснение состоит в том, что у *A. mikadoi* разные ткани могут иметь различную плоидность. Повышенное содержание ДНК обнаружено в эритроцитах, а мы подсчитывали хромосомы в культуре клеток мезенхимальных предшественников. Также следует иметь в виду отсутствие генетической идентификации образца осетра, исследованного в работе [5]. Детальное рассмотрение этой проблемы запланировано нами на ближайшее будущее.

Авторы выражают благодарность А.В. Зеленину за интерес к работе и ее поддержку.

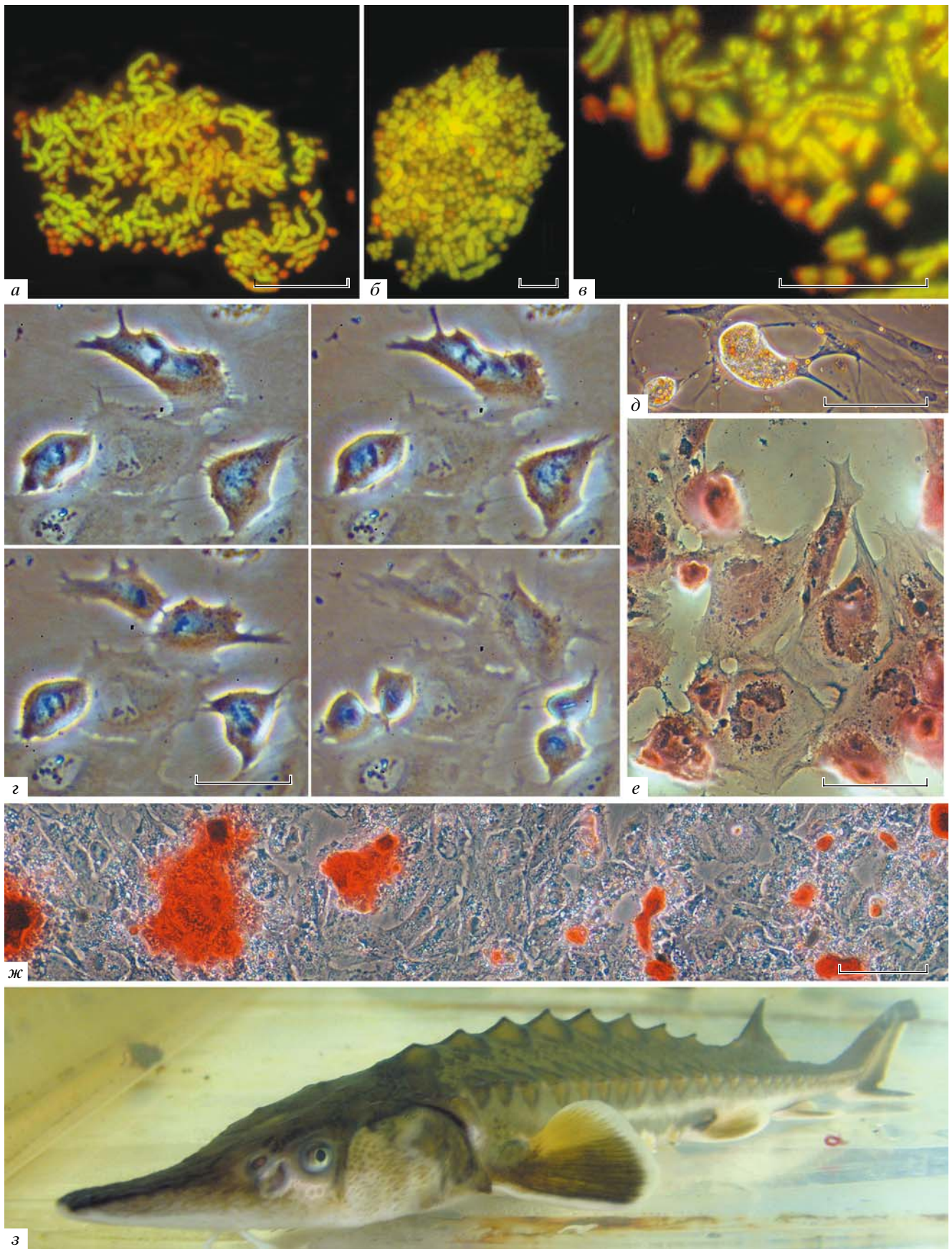
#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Omoto N., Maebayashi M., Hara A., Adashi S., Yamauchi K. Gonadal maturity in wild sturgeons, *Huso dauricus*, *Acipenser mikadoi* and *A. schrenckii* caught near Hokkaido Japan. // Environmental. Biol. Fishes. 2004. V. 70. P. 381-391.
2. Любаев В.Я. Маточное стадо сахалинского (зеленого) осетра как генофондная основа для сохранения вида // Материалы международной конференции "Сохранение генетических ресурсов". Санкт-Петербург, 19–22 октября 2004. С. 812–813.
3. Drokin, S.I., Kopeika E.F. Motility of and phospholipid content in cryopreserved spermatozoa of three sturgeon species // Sturg. Quart. 1996. V. 4. P. 8–10.
4. Цветкова Л.И., Докина О.Б., Пронина Н.Д., Миленко В.А. Криоконсервация спермы рыб: состояние, развитие, перспективы // Избранные труды ВНИИПРХ (в четырех томах). Дмитров: изд. дом "Север Подмосковья". 2002. Т. I–II. С. 358–365.
5. Birstein V.J., Poletaev A.I., Goncharov B.F. DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry // Cytometry. 1993. V. 14. P. 377–383.
6. Birstein V.J., Hanner R., DeSalle R. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches // Environmental Biol. Fishes. 1997. V. 48. P. 127–155.
7. Wang G., LaPatra S., Zeng L., Zhao Z., Lu Y. Establishment, growth, cryopreservation and species of origin identification of three cell lines from white sturgeon, *Acipenser transmontanus* // Methods Cell Sci. 2003. V. 25. P. 211–220.
8. Li M.F., Marrayatt V., Annand C., Odense P. Fish cell cultures: Two newly developed cell lines from Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) and guppy (*Poecilia reticulata*) // Can. J. Zool. 1985. V. 63. P. 2867–2874.
9. Watson L.R., Groff J.M., Hedrick R.P. Replication and pathogenesis of white sturgeon iridovirus (WSIV) in experimentally infected white sturgeon *Acipenser transmontanus* juveniles and sturgeon cell lines // Dis. Aquat. Org. 1998. V. 32. P. 173–184.
10. Артюхин Е.Н., Андронов А.Е. О некоторых чертах биологии осетра р. Тумнин // Осетровое хозяйство водоемов СССР. Тез. докл. Ч. 1. Астрахань. 1989. С. 9–10.
11. Артюхин Е.Н., Андронов А.Е. Морфобиологический очерк зеленого осетра *Acipenser medirostris* (Chondrostei, Acipenseridae) из реки Тумнин (Датта) и некоторые аспекты экологии и зоогеографии осетровых // Зоол. журнал. 1990. Т. 69. С. 81–91.
12. Mikodina E.V., Khrisanfov V.E., Lyubaev V.Ya., Presnyakov A.V. Artificial spawning of Sakhalin sturgeon in Russia // Abstracts of International Conference "2006. Aqua-2006". 9–13 May, Florence, Italy. P. 610.
13. Aljanabi S.M., Martinez I.I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 4692–4693.
14. Мюге Н.С., Барминцева А.Е., Распорзуев С.М., Мюге В.Н., Барминцев В.А. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // Генетика. 2008. Т. 44. С. 913–919.
15. Ayres W.O. Descriptions of three new species of sturgeon from San Francisco // Proc. California Acad. Nat. Sci. 1854. V. 1. P. 14–15.
16. Hilgendorf F. Uber eine neue Stor-Art aus Nord-Japan (*Acipenser mikadoi*) // Sitzungsber. Ges. Naturf. Freunde. 1892. Berlin. P. 142–144.
17. Elkins C., Miller J., Kaplan J. Petition to list the North American green sturgeon (*Acipenser medirostris*) as an endangered or threatened species under the endangered species act // Environmental protection information center, center for biological diversity waterkeepers northern California petitioners. June 2001 ([http://www.biologicaldiversity.org/species/fish/North\\_American\\_green\\_sturgeon/pdfs/PETITION.PDF](http://www.biologicaldiversity.org/species/fish/North_American_green_sturgeon/pdfs/PETITION.PDF)).
18. Birstein V.J., Bemis W.E. How many species are there within the genus *Acipenser*? // Environmental Biol. Fishes. 1997. V. 48. P. 157–163.
19. Birstein V.J., DeSalle R. Molecular phylogeny of Acipenserinae // Mol. Phyl. Evol. 1998. V. 9. P. 141–155.
20. Prasanna I., Lakra W.S., Ogale S.N., Bhone R.R. Cell culture from fin explants of endangered golden mahseer, *Tor putitora* (Hamilton) // Current Sci. 2000. V. 79. P. 93–95.

21. Alvarez M.C., Bejar J., Chen S., Hong Y. Fish ES cells and application to biotechnology // *Marine Biotech.* 2006. V. 9. P. 117–127.
22. Fontana F., Lanfredi M., Rossi R., Bronzi P., Arlati G. Established cell lines from three sturgeon species // *Sturg. Quart.* 1995. V. 3. P. 6–7.
23. Hedrick R.P., McDowell T.S., Rosenmark R., Aronstein D., Lannan C.N. Two cell lines from white sturgeon // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 1991. V. 120. P. 528–534.
24. Li M.F., Marrayatt V., Annand C., Odense P. Fish cell culture: two newly developed cell lines from Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) and guppy (*Poecilia reticulata*) // *Canad. J. Zool.* 1985. V. 63. P. 2867–2874.
25. Ramirez R.D., Morales C.P., Herbert B.S., Rohde J.M., Passons C., Shay J.W., Wright W.E. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions // *Genes Dev.* 2001. V. 15. P. 398–403.
26. Dashinimaev E.B., Vishnyakova K.S., Popov K.V., Yegorov Y.E. Stable culture of hTERT-transduced human embryonic neural stem cells holds all the features of primary culture // *Electronic J. Biol.* July 2008 (accepted).
27. Shima F., Nikaido O., Shinohara S., Egami N. Continued *in vitro* growth of fibroblast-like cells (RBCF-1) derived from the caudal fin of the fish, *Carassius auratus* // *Exp. Gerontol.* 1980. V. 15. P. 305–314.
28. Панюхин Н.В., Вишнякова Х.С., Егоров Е.Е. Влияние парциального давления кислорода на выживаемость, пролиферацию и дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга мыши // *Биол. мембраны.* 2008. Т. 25. С. 260–267.
29. Nowruzfashkhami M.R., Safaian S., Bahmani M., Chubian F. Karyotype analysis in ship sturgeon *Acipenser nudiventris* in the south Caspian Sea using leukocyte culture // *J. Appl. Ichthyol.* 2006. V. 22 (Suppl. 1). P. 97–98.
30. Fontana F., Congiu L., Mudrak V.A., Quattro J.M., Smith T.I.J., Ware K., Doroshov S.I. Evidence of hexaploid karyotype in shortnose sturgeon // *Genome.* 2008. V. 51. P. 113–119.
31. Fontana F., Tagliavini J., Congiu L., Lanfredi M., Chicca M., Laurenti C., Rossi R. Karyotypic characterization of the great sturgeon, *Huso huso*, by multiple staining techniques and fluorescent *in situ* hybridization // *Mar. Biol.* 1998. V. 132. P. 495–501.
32. Tagliavini J., Williot P., Congiu L., Chicca M., Lanfredi M., Rossi R., Fontana F. Molecular cytogenetic analysis of the karyotype of the European Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio* // *Heredity.* 1999. V. 83. P. 520–525.
33. Chicca M., Suci R., Ene C., Lanfredi M., Congiu L., Leis M., Tagliavini J., Rossi R., Fontana F. Karyotype characterization of the stellate sturgeon, *Acipenser stellatus*, by chromosome banding and fluorescent *in situ* hybridization // *J. Appl. Ichthyol.* 2002. V. 18. P. 298–300.
34. Fontana F., Lanfredi M., Chicca M., Congiu L., Tagliavini J., Rossi R. Fluorescent *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of *Acipenser ruthenus* and *Acipenser naccarii* (Osteichthyes Acipenseriformes) // *Genome.* 1999. V. 42. P. 1008–1012.
35. Fontana F., Lanfredi M., Kirschbaum F., Garrido-Ramos M.A., Robles F., Forlani A., Congiu L. Comparison of karyotypes of *Acipenser oxyrinchus* and *A. sturio* by chromosome banding and fluorescent *in situ* hybridization // *Genetica.* 2008. V. 132. P. 281–286.
36. Nowruzfashkhami M.R., Safaian S., Bahmani M., Chubian F. Karyotype analysis in ship sturgeon *Acipenser nudiventris* in the south Caspian Sea using leukocyte culture // *J. Appl. Ichthyol.* 2006. V. 22 (Suppl. 1). P. 97–98.
37. Fontana F. Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces) // *Genome.* 1994. V. 37. P. 888–892.
38. van Eenennaam A.L., Murray J.D., Medrano J.F. Karyotype of the American green sturgeon // *Transactions Amer. Fisheries Soc.* 1999. V. 128. P. 175–177.
39. Nowruzfashkhami M.R., Pourkazemi M., Baradaran-noveiri S. Chromosome study of persian sturgeon *Acipenser persicus B* // *Cytologia.* 2000. V. 65. P. 197–202.
40. Fontana F., Lanfredi M., Rossi R., Bronzi P., Arlati G. Karyotypic characterization of *Acipenser gueldenstaedti* with C-, AgNO<sub>3</sub> and fluorescence banding techniques // *Ital. J. Zool.* 1996. V. 63. P. 113–118.
41. Fontana F., Bruch R.M., Binkowski F.P., Lanfredi M., Chicca M., Beltrami N., Congiu L. Karyotype characterization of the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens* (Rafinesque, 1817) by chromosome banding and fluorescent *in situ* hybridization // *Genome.* 2004. V. 47. P. 742–746.
42. Yu X., Zhou T., Li K., Li Y., Zhou M. On the karyosystematics of cyprinid fishes and a summary of fish chromosome studies in China // *Genetica.* 1987. V. 72. P. 225–236.
43. van Eenennaam A.L., Murray J.D., Medrano J.F. Mitotic analysis of the North American white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson (Pisces, Acipenseridae), a fish with a very high chromosome number // *Genome.* 1998. V. 41. P. 266–271.
44. Kim D.S., Nam Y.K., Noh J.K., Park C.H., Chapman F.A. Karyotype of north American shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* with the highest chromosome number in the Acipenseriformes // *Ichthyological Res.* 2005. V. 52. P. 94–97.
45. Ким Е.С., Пунина Е.О., Родионов А.В. CPD/(PI/DAPI)- и CMA/DAPI-дифференциальная исчерченность хромосом *Allium cepa* L. // *Генетика.* 2002. Т. 38. С. 489–496.

**Cell Culture and Karyotype of Sakhalin Sturgeon *Acipenser mikadoi*****К. С. Vishnyakova, N. S. Mугue\*, D. A. Zelenina\*, E. V. Mikodina\*,  
O. A. Kovaleva\*\*, G. V. Madan\*\*\*, Y. E. Yegorov***Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova, 32, Moscow, 119991 Russia; e-mail: yegorov@eimb.ru; yegorov58@mail.ru**\*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO),  
ul. V. Krasnosel'skaya, 17, Moscow, 107140 Russia**\*\* FGU "TSUREN", B. Kislovski per., 10, Moscow, 125009 Russia**\*\*\* Moscow Physico-Technical Institute, Institutski per., 9, Dolgoprudnyi, Moscow oblast, 141700 Russia*

Cell culture of a rare threatened species of Sakhalin sturgeon *Acipenser mikadoi*, was obtained from a fragment of pectoral fin and neighboring tissues. At the beginning the culture consisted of cells of different types including typical fibroblasts as well as cells of epithelial origin, myofibroblasts, etc. After approximately five passages, the culture contained mainly cells of fibroblast morphology. In the normal culturing conditions, these cells grew for more than one year with constant rate and passed approximately 80 population doublings. In the absence of serum, the cells passed into the state of proliferative quiescence ( $G_0$ -state). After a long culturing without media replacement the cells fused and formed myofibers about 1 cm long. These myofibers exhibited an ability to branch out and with time acquired cross striation. After cultivation for approximately 40 days, myofibers degenerated, lost their morphological features, detached from the substrate, and died. Induction of adipogenic differentiation led to the proliferation arrest and appearance of lipophilic inclusions in some cells. The quantity of these inclusions was restricted; cells with inclusions considerably varied by morphology and did not resemble adipocytes. Induction of osteogenic differentiation led to the emergence of cells producing mineralized extracellular matrix and formation of bone nodules. Chromosome analysis revealed a set of chromosomes typical for several sturgeon species. The variability of the chromosome numbers was very high (mean  $247 \pm \pm 33$ , mode 248). Using AT- and GC-specific fluorescent ligands it was found that telomeric and centromeric regions of all chromosomes are enriched by GC-sequences. Distribution of AT- and GC-rich sequences among chromosomes was heterogeneous. Long chromosomes were preferentially stained by an AT-specific DAPI whereas small chromosomes had brighter fluorescence after 7-aminoactinomycin D treatment. Several small chromosomes fluoresced extremely bright after that. Our work is a first attempt of the Sakhalin sturgeon cell culturing and karyotype analysis.



**Рис. 5.** Сахалинский осетр. *a – в* – Метафазные пластинки, *z* – митозы, *д* – липофильные вакуоли при индукции адипогенной дифференцировки, *е* – накопление минерализованного матрикса при индукции остеогенной дифференцировки, *ж* – формирование костных узелков, *з* – *A. mikadoi* в аквариуме. Масштабные полоски: *a* – 25 мкм, *б* и *в* – 10 мкм, *z* – 50 мкм, *д* и *е* – 100 мкм, *ж* – 500 мкм.

