

В. Э. ЛЕОНОВИЧ, Л. А. МАНУКЯН

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ДНК И РАЗМЕРЫ ЯДЕР КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК НЕКОТОРЫХ ПТИЦ

С развитием цитологии все большее значение приобретает метод культивирования клеток, роль которого трудно переоценить. Культивируемые клетки полностью лишаются корректирующего влияния организма, оказываясь, таким образом, во власти окружающих условий среды. Находясь в состоянии саморегуляции жизненных процессов, изолированные клетки являются хорошим объектом для изучения вопросов автономности физиологических отправления. Наряду с известным фактом унификации клеточных элементов в условиях культивирования, клетки берут на себя ряд функций, усиливая или вновь приобретая некоторые морфологические, метаболические и репродукционные свойства [4, 16].

Используя культуры клеток птиц разных видов, мы поставили перед собой задачу выяснить, способны ли клетки—самостоятельно живущие структурные элементы целостного организма—сохранить в себе специфические признаки и в состоянии ли они передавать их по наследству. Иначе говоря, отличаются ли культуры клеток, имеющие различное видовое происхождение, друг от друга и как долго сохраняются эти различия. Объектом исследования служили клетки почечного эпителия кур, цесарок и половых гибридов между ними. Известно, что в ряде случаев клетки гибридных особей отличаются большими размерами ядер, повышенным содержанием ДНК в них и т. д. [19, 21]. Поэтому представляет интерес также вопрос, будут ли клетки гибридных организмов превосходить или хотя бы отличаться по ряду свойств от таковых исходных видов в условиях искусственного выращивания. В целях выяснения указанных вопросов культуры первично эксплантированных клеток подвергались анализу на содержание ДНК в ядрах, а также сравнивались по признаку величин ядер.

Методика. Клетки трипсинизировались и культивировались в течение 16-и суток без смены среды по методике, описанной нами ранее [5, 6]. Применялась стандартная среда—гидролизат лактальбумина (0,5%), производства МНИИВП, с добавлением 10% сыворотки КРС. Препараты, предназначенные для анализа содержания ДНК, фиксировались в смеси уксусной кислоты с абсолютным спиртом и окрашивались по Фельгену. Количество ДНК определялось на аппаратах МУФ-6 и МФ-4 методом цитофотометрирования. На каждый случай анализировалось по 100 клеток каждой формы птиц. Всего было профотометрировано более

900 ядер. В целях определения динамики размеров ядер аналогичным способом культивируемые клетки фиксировались в растворе Буэна с последующей окраской гематоксилином и эозином. Увеличенные проекции клеток зарисовывались с помощью аппарата ФМН-2. Рисунки обводились планиметром; конечные результаты выражались в μ^2 . На каждый случай измерялось по 200 ядер от каждой формы птиц; таким образом, всего было исследовано более 3000 клеток. Данные обоих экспериментов были обработаны биометрически [17].

Результаты и обсуждение. Подобранные сроки взятия проб для анализа динамики ДНК (2-й, 8-й, 16-й дни культивирования) соответствуют периодам начала логарифмической стадии роста, расцвета и дегенерации монослоя. Результаты опыта, а также математической обработки полученного материала приводятся в табл. 1. На 2-й день культивиро-

Таблица 1

Содержание ДНК в ядрах клеток кур, цесарок и гибридов в процессе культивирования

Наименование	Lim	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\pm S$	V, %
K2	0,067—0,252	0,108 $\pm$ 0,0033	0,033	30,6
Ц2	0,050—0,198	0,117 $\pm$ 0,0028	0,029	24,7
Г2	0,053—0,235	0,121 $\pm$ 0,0033	0,033	27,0
Г8	0,063—0,305	0,177 $\pm$ 0,0047	0,047	26,6
Ц8	0,072—0,464	0,193 $\pm$ 0,0082	0,087	45,1
Г8	0,051—0,437	0,185 $\pm$ 0,0092	0,092	49,7
К16	0,062—0,428	0,154 $\pm$ 0,0060	0,060	38,9
Ц16	0,054—0,422	0,159 $\pm$ 0,0081	0,080	50,4
Г16	0,060—0,318	0,154 $\pm$ 0,0052	0,053	34,7

вания среднее содержание ДНК, приходящейся на ядро, в клетках кур равнялось 0,108, цесарок—0,117, гибридов—0,121 условных единиц. В литературе имеются данные относительно содержания ДНК в ядрах клеток кур и цесарок [11]. Однако неидентичность используемых методик, способа выражения конечных результатов, а также типа анализируемых тканей лишает нас оснований для сравнения с ними наших данных. И все же здесь создаются предпосылки для сопоставления относительных цифровых значений. Так, например, в упомянутой монографии в эритроцитах кур обнаружено больше ДНК, чем в таковых цесарок, в то время как по нашим данным, полученным на культивируемых клетках почек, наблюдается обратная зависимость. По неопубликованным данным А. А. Чилингаряна, в ядрах печеночных клеток количество ДНК последовательно увеличивается у кур, цесарок и гибридов. У нас на 2-й день культивирования наблюдается аналогичная зависимость в комбинации курица—цесарка—гибрид. О превышении содержания ДНК в ядрах клеток гибридных организмов над таковыми исходных видов свидетельствуют также исследования Магакяна [7], Чилингаряна и др. [20]. Таким образом, на 2-й день культивирования мы наблюдаем аналогичную интактным клеткам картину преимущественного накопления ДНК в клетках, ведущих начало от гибридных организмов. Хотя разница в содер-

жании этой кислоты между клетками гибридов и исходных видов не велика ($t_1=2,8$; $t_2=0,92$), тем не менее очевидно, что этот признак, носителем которого был гибрид первого поколения, нашел отражение в генотипе организма. На 8-е сутки существования культур наибольшее количество ДНК наблюдается в клетках цесарок, наименьшее — в клетках кур. «Гибридные» клетки занимают промежуточное положение. По-видимому, признак наибольшего содержания ДНК в клетках гибридов оказался генетически недостаточно закрепленным. Очевидно, что в этот период выращивания вступают в свои права модуляторы культурального характера, ведущие к унификации признаков, так как разница между содержанием ДНК во всех трех типах клеток еще более уменьшается ($t_1=1,7$; $t_2=0,65$; $t_3=0,77$). При сравнении величин, характеризующих количество ДНК в клетках 2-х и 8-и дневной культуры, наблюдается их повышение в среднем в 1,6 раза. Вполне вероятно, что характер повышения этого признака идентичен с таковым, проявляющимся при исследовании митотической активности клеток. Известно, что нарастание пролиферативной активности обуславливает не столько стимулирование этого процесса, сколько устранение ингибирующих факторов [9]. Если предположить, что регулирующий синтез ДНК фактор действует аналогично стимулятору, повышающему митотическую активность, то при попадании в условия культивирования клетки лишаются этих ингибирующих воздействий, имеющих место в интактном организме. Следствием этого может явиться иной, практически новый уровень синтеза ДНК, свойственный лишь культивируемым клеткам. В то же время нельзя отрицать, что выращиваемые клетки обладают определенной саморегуляционной способностью. Имея перед собой картину синхронного изменения ДНК на 8-й и 16-й дни культивирования (рис. 1), трудно говорить об отсутствии механизмов, стабилизирующих синтез ее в определенных пределах. На 16-й день выращивания видоспецифические регуляторы синтеза ДНК почти полностью бездействуют. Практически одинаковый уровень содержания ее в культурах разных типов клеток ($t_1=0,49$; $t_2=0,44$; $t_3=0$) говорит о высокой степени унификации, с одной стороны, и о наличии безошибочно действующего стабилизатора, сохраняющего этот признак на строго определенном уровне, с другой. Причины общего снижения количества ДНК во всех трех культурах клеток заключаются, по-видимому, в специфике развития первичной культуры. Тенденция к падению физиологической активности клеток, изменение физико-химических параметров среды, накопление в ней ядовитых продуктов распада и метаболизма, истощение ростовых потенциалов клеток — все это накладывает определенный отпечаток на ход синтеза ДНК, уровень которой резко понижается к этому периоду жизни культуры (рис. 1). Очевидно, что колебания среднего количества ДНК зависят не столько от изменения кариотипа части клеток, сколько от перехода их из одного класса плоидности в другой. В литературе имеется большое количество сведений относительно соматической полиплоидизации [2, 3, 23]. Культивируемые клетки также имеют ярко выраженную тенденцию к повы-

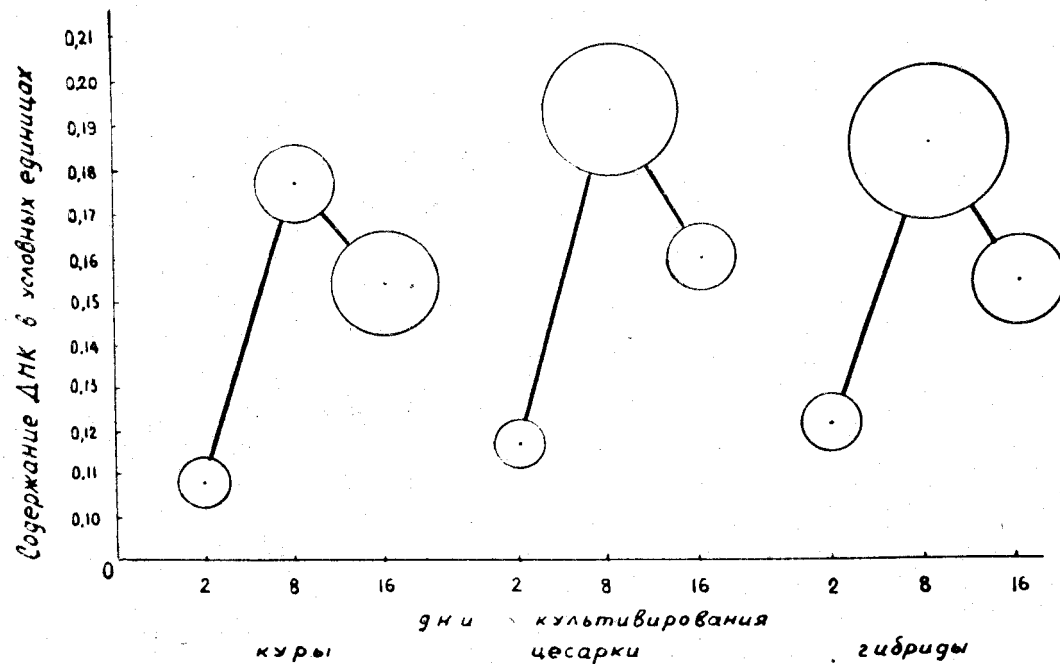


Рис. 1. Графическое изображение динамики ДНК в процессе культивирования клеток.

шению ploидности [12, 13, 14]. По-видимому, снятие влияния корригирующих систем организма, а также специфические условия существования приводят к переходу определенной доли клеток в высшие классы ploидности. Исходя из наличия определенных закономерностей изменения содержания ДНК, можно сделать вывод о наличии стабилизаторов культурального характера, регулирующих этот процесс.

Сложность процессов в биохимических взаимоотношениях ядра и цитоплазмы, особая роль, выполняемая ДНК ядра, определяют комплекс морфологических признаков, одним из проявлений которого является связь между размерами ядер и клеток и содержанием дезоксирибонуклеиновой кислоты [10]. Даже в ядрах, находящихся по своему хромосомному составу в промежутках между классами ploидности, отклонение количества ДНК находит свое отражение в изменении величин ядер [24]. Сушковым [15] было показано, что при равноценных оптимальных условиях выращивания размеры ядер клеток каждого типа ткани есть величина постоянная. Вместе с тем имеет место определенная динамика изменений этого признака в процессе культивирования. Так, автором было показано, что в перевиваемых в течение ряда лет клетках наблюдается тенденция к закономерному укрупнению величин ядер. Таким образом, кроме изменения ploидности, на размеры ядер влияет также ряд факторов, обусловленных спецификой условий искусственного выращивания.

Препараты для анализа динамики размеров ядер изготавливались на 2-й, 6-й, 8-й, 12-й, 16-й дни выращивания культуры. В результате планиметрирования ядер были найдены средние арифметические значения их площадей, выраженных в μ^2 (табл. 2). На 2-й день выращивания ядра

Таблица 2

Размеры ядер культивируемых клеток кур, цесарок и гибридов

Дни куль- тивации	Клетки кур			Клетки цесарок			Клетки гибридов		
	Lim	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\pm S$	Lim	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\pm S$	Lim	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\pm S$
2	31,8— 72,5	51,7 $\pm$ 0,67	9,50	21,9— 67,9	43,0 $\pm$ 0,65	9,15	24,2— 72,5	43,1 $\pm$ 0,62	8,77
6	41,4— 118,5	68,8 $\pm$ 0,94	13,33	32,2— 94,3	60,4 $\pm$ 0,86	12,14	41,4— 118,5	76,7 $\pm$ 0,98	13,83
8	67,9— 141,5	97,6 $\pm$ 1,09	15,48	50,6— 123,1	79,4 $\pm$ 0,97	13,74	72,5— 138,0	107,7 $\pm$ 1,11	15,66
12	58,9— 156,4	106,8 $\pm$ 1,43	20,23	32,8— 131,1	87,5 $\pm$ 1,03	14,60	57,5— 131,1	91,7 $\pm$ 1,06	15,00
16	71,3— 203,6	118,4 $\pm$ 2,00	28,30	50,6— 163,3	86,9 $\pm$ 1,09	15,50	65,6— 147,2	98,0 $\pm$ 1,19	16,92

клеток цесарок и гибридов имеют одинаковую величину, равную 43 μ^2 , в то время как средняя площадь ядер клеток кур достигает 52 μ^2 . Сред-

ние площади ядер к следующему сроку взятия проб во всех трех группах клеток увеличились в 1,4—1,8 раз (рис. 2), причем темпы нарастания ядерных величин у клеток кур и цесарок практически одинаковы, в то время как у клеток гибридов степень прироста значительно выше. Необходимо отметить, что в тот же период логарифмического роста культур, как мы упоминали выше, произошло возрастание среднего содержания ДНК в 1,6 раза. Таким образом, динамика этих величин в начале культивирования оказалась более или менее синхронной. Высокие темпы роста размеров ядер клеток гибридов сохраняются и к 8-у дню выращивания, где площади последних достигают $108 \mu^2$, при отставании ядер клеток кур и цесарок соответственно на 10 и $29 \mu^2$. Факт значительного отставания размеров ядер цесарок от таковых кур и гибридов с известной осторожностью можно объяснить скороспелостью последних.

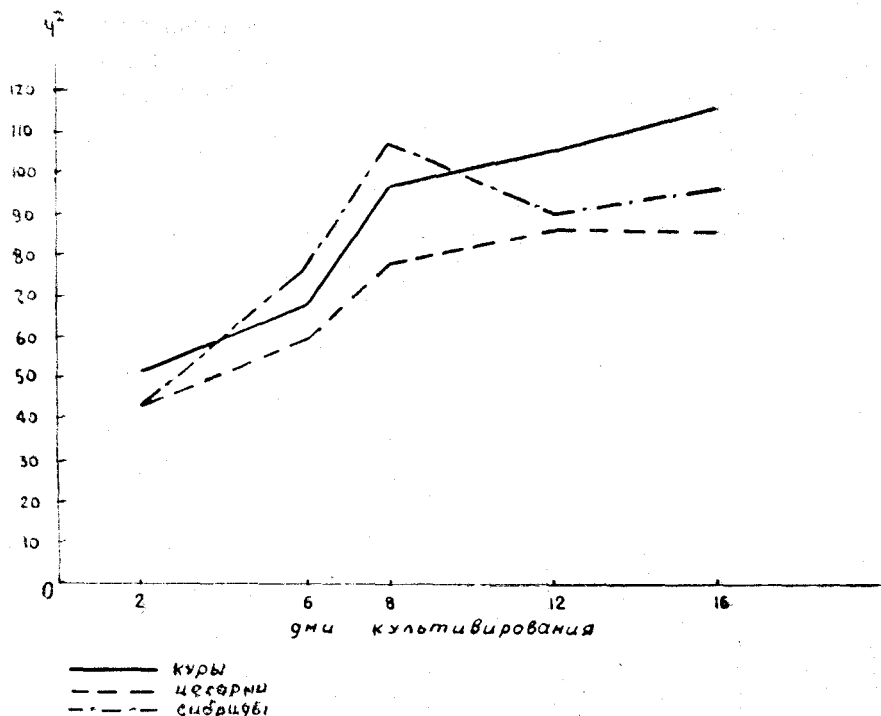


Рис. 2. Колебания размеров ядер клеток в процессе культивирования.

Если учесть, что ядро является основным коррегирующим центром клеточных отправлений и явление увеличения ядер в активно функционирующей ткани—общепризнанный процесс, то становится вполне закономерным их преимущественный рост в клетках кур. То же самое можно сказать и о гибридах. Известно, что при межпородном и межвидовом скрещивании гибриды нередко обладают повышенными ростовыми потенциями, что, в частности, отражается на возрастании их ядерных величин [21]. Подобную картину можно наблюдать на рис. 2, где в период максимальной активности моносоля имеет место значительное превосходство клеток гибридов, как по темпам роста размеров ядер, так и в отношении абсолютных величин. Это дает некоторые основания

предположить, что регуляция ядерных размеров осуществляется и со стороны самой клетки, так как в отсутствие корректирующих воздействий организма признак этот продолжает проявляться. Кроме того, специфика роста ядер клеток гибридного организма проявляется на протяжении определенного промежутка времени, что говорит о способности клеток передавать данный признак по наследству. С 8-х суток выращивания и до конца культивирования наблюдаются относительно невысокие темпы роста ядерных величин в клетках кур (максимум = $118 \mu^2$ на 16-й день) и стабилизация этого показателя на уровне 12-го дня у цесарок. Размеры ядер гибридов, упав к этому сроку до $92 \mu^2$, к концу культивирования повышаются всего на $6 \mu^2$. Не вызывает сомнения факт, что на динамику этих величин, кроме функционального состояния культуры, оказывает также влияние изменяющийся в результате метаболизма состав среды, а также видоспецифическая реакция клеток, имеющих различное происхождение, на одинаковые условия выращивания.

Обратим теперь внимание на несоответствие динамики изменений параметров ядер и содержания ДНК в них во вторую половину первичного культивирования. Ядерные величины клеток гибридов и цесарок относительно уменьшаются, при наличии интенсивного их роста в культурах клеток кур. В то же время, содержание ДНК во всех трех культурах резко и синхронно понижается. Выше говорилось, что существует определенная связь между величиной ядер и полиплоидизацией, а следовательно, и содержанием ДНК. Несомненность этого факта подтверждается материалами литературных источников [1, 8, 22]. В ряде случаев, аналогичная зависимость наблюдается и в условиях искусственного выращивания [18]. Специфика постановки нашего эксперимента (выращивание без смены питательной среды) и характер полученных результатов позволяют прийти к заключению о необязательности подобной корреляции. Следует напомнить, что в первой половине культивирования рост количества ДНК соответствовал увеличению размеров ядер. По-видимому, действие модуляторов, регулирующих эти процессы, продолжало иметь место в начале культивирования, то есть при относительном сохранении закономерностей организма. Начиная с 10—12 суток выращивания закономерности эти нарушаются, и теряется зависимость между ядерными величинами и содержанием в них ДНК.

В ы в о ы

1. Для культивируемых клеток почечного эпителия птиц характерно повышение содержания ДНК к моменту возрастания функциональной активности монослоя и падение ее в период инволюции культуры.

2. Имеющаяся разница в содержании ДНК между культивируемыми клетками кур, цесарок и гибридов нивелируется по мере развития культуры.

3. Динамика изменений количества ДНК, по-видимому, связана с явлением перехода клеток из одного класса плоидности в другой и зависит от функционального состояния монослоя.

4. Ядра клеток гибридов отличаются повышенными темпами роста и абсолютными размерами в период становления монослоя и интенсивным спадом этих величин в фазе его стабилизации.

5. Существует прямая зависимость между ростом величин ядер и содержанием ДНК в них на первых этапах выращивания; во вторую половину культивирования зависимость эта нарушается.

6. В процессе культивирования, вследствие известной автономности регуляции обменных процессов, клетки способны удерживать свойственные им размеры ядер и количество ДНК в определенных границах.

Зоологический институт АН АрмССР,
Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 18.IX 1968 г.

Վ. Է. ԼԵՈՆՈՎԻՉ, Լ. Ա. ՄԱՆՈՒԿՅԱՆ

ՈՐՈՇ ԹՈՉՈՒՆՆԵՐԻ ԿՈՒԼՏԻՎԱՅՎԱԾ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՄՈՏ ԴՆԹ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅԱՆ
ԴԻՆԱՄԻԿԱՆ ԵՎ ԿՈՐԻՋՆԵՐԻ ՉԱՓԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Օգտագործվել է տարբեր տեսակի թռչունների բջիջների կուլտուրան՝ պարզելու համար, թե արդյոք ընդունակ են բջիջները՝ ամբողջական օրգանիզմի ինքնուրույն ապրող կառուցվածքային տարրերը, ապահովելու իրենց մեջ որոշ յուրահատուկ նշաններ և ի վիճակի՝ են արդյոք այդ նշանները հաղորդելու ժառանգաբար:

Առանց միջավայրի փոփոխման 16 օրվա ընթացքում աճեցվել են հավի, նումիդահավի և նրանց մեջ եղած հիբրիդների երկվամային էպիթելի բջիջները: Պարզվել է, որ աճման առաջին էտապում գոյություն ունի ուղիղ համեմատական կապ կորիզների մեծության աճի և ԴՆԹ-ի պարունակության միջև, իսկ կուլտիվացիայի երկրորդ կեսին այդ կապը խախտվում է:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бродский В. Я. Журнал общей биологии, 25, 1, 1964.
2. Бродский В. Я. Трофика клетки, М., изд. Наука, 1966.
3. Жинкин Л. Н. Архив АГЭ, 42, 1, 1962.
4. Залкинд С. Я., Доссер Е. М., Дорофеев В. М. Архив АГЭ, 49, 10, 1965.
5. Леонович В. Э. Биол. журнал Армении, 20, 4, 1967.
6. Леонович В. Э. Материалы 10 научной конференции физиологов. Ереван, изд. АН АрмССР, 1967.
7. Магакян Ю. А. Журнал общей биологии, 24, 5, 1963.
8. Манукян Л. А. Цитология, 1969 (в печати).
9. Мэзия Д. Митоз и физиология клеточного деления, М., изд. Иностр. литер., 1963.
10. Нилова В. К. Цитология, 7, 5, 1965.
11. де Робертис Е., Новинский В., Сазс Ф. Общая цитология, М., изд. Иностр. литер., 1962.

12. С в а н и д з е И. К. Архив АГЭ, 49, 11, 1965.
13. С е р г е е в В. А. Размножение вирусов животных в культуре ткани, М., изд. Колос, 1966.
14. С т а р о в е р о в а Н. С. Тезисы докладов 4 итоговой научной конференции Ин-та экспер. и клинической онкологии АМН СССР, 1961.
15. С у ш к о в Ф. В. Матер. Научно-методической конф. анатомов, гистологов и эмбриологов сельскохозяйственных ВУЗов, вып. 2, М., 1963.
16. Т э р е И. Журнал общей биологии, 20, 3, 1959.
17. У р б а х В. Ю. Биометрические методы, М., изд. Наука, 1964.
18. Х е с и н Я. Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток, М., изд. Медицина, 1967.
19. Ч и л и н г а р я н А. А., П а в л о в Е. Ф. ДАН АрмССР, 32, 1, 1961.
20. Ч и л и н г а р я н А. А., П а в л о в Е. Ф., М к р т ч я н Л. П. Известия АН АрмССР, 17, 9, 1964.
21. Ч и л и н г а р я н А. А. Зоологический сборник, вып. 14, Ереван, изд. АН АрмССР, 1966.
22. Ш е р б а к о в В. К. Цитология, 4, 5, 1962.
3. P a r t a n e n C. R. J. Heredity, 52, 4, 1961.
24. P o g o А. О., P o g o В. G. T., C o r d e r o F u n e s J. R. Exptl. Cell Res., 20, 1, 1960.