

В. Э. ЛЕОНОВИЧ

О МОРФОЛОГИИ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРОЛИКА *IN VITRO*

Вследствие того, что печень состоит из морфологически и функционально различных клеток, возникают определенные трудности при идентификации растущих *in vitro* клеток [5, 6, 13]. По этой причине культура печеночных клеток не нашла широкого применения в цитологических и вирусологических исследованиях. Из немногочисленных исследований по культивированию печеночных клеток заслуживают внимания работы Питзурри [11], Придза [12], Ангелуччи [4], Пика [10] и др. Указанные авторы для суспензирования клеток применяли как механические способы [11, 12], так и ферментативные — с помощью трипсина [4, 10]. В дальнейшем клетки выращивались в довольно сложных питательных средах. Так, например, для роста печеночных клеток Карви [6] применял водный раствор ферментативного гидролизата казеина, а многие авторы употребляли эмбриональные экстракты [1, 2, 4, 9]. Много внимания было уделено исследованию гистохимии клеток печени в культуре. В частности, выяснялись обменные процессы в клетке, определялись нуклеиновые кислоты, гликоген, активность АТФ, фосфатазы и др. [5, 8, 12, 15].

В настоящей работе сделана попытка выращивания клеток печени *in vitro* с применением общепринятых методик трипсинизации и последующим выращиванием в обычных питательных средах. Кроме того, культивируемые клетки были подвергнуты морфологическому анализу.

В качестве исходного материала была использована печень крольчонка 4-дневного возраста. Изолированная, мелко нарезанная и тщательно промытая ткань подвергалась разовой трипсинизации при 37° на магнитной мешалке. Затем клетки осаждались центрифугированием и разбавлялись питательной жидкостью (среда 199 + 10% сыворотки крупного рогатого скота) с таким расчетом, чтобы в 1 мл получить $2-4 \times 10^4$ клеток, что является оптимальной концентрацией при посеве. Посев производился на покровных стеклах и чашках Каррели и в пробирках. Среда менялась через каждые 4 дня. Окрашивание и наблюдение за растущими клетками производилось ежедневно. Препараты фиксировались жидкостью Буэна с последующей окраской гематоксилином-эозином и заключением в бальзам.

Рост печеночных клеток в культуре начинается сравнительно медленно. На второй день культивирования прикрепившихся к стеклу клеток довольно много, но рост не наблюдается. Клетки небольшой величины, имеют круглую, реже овальную форму. Ядро ярко окрашено, крупное, занимает центральное, реже пристеночное положение. Цитоплазмы сравнительно мало, она слабо окрашена и располагается обычно тонким

кольцом вокруг ядра. На 4-ый день наблюдаются отдельные редкие колонии размножающихся клеток. Клетки крупные, фибробластоподобного типа, сильно вытянутые, двух-четырёхотростковые, имеют интенсивно окрашенные овальные ядра и цитоплазму. На 5—6-й день (рис. 1) куль-



Рис. 1. А — фибробластоподобные, Б — эпителиоподобные клетки. 5-ый день культивирования. Фиксация Буэном, окраска гематоксилин-эозином, увеличение 10X гомаль 1.

тура представляет собой типичную фибробластоподобную сеть. Отдельные растущие клетки, соприкасаясь своими отростками, образуют по всему препарату характерную рыхлую структуру. Форма клеток вытянутая, двух-четырёхотростковая. Изредка встречаются перетеновидные клетки. Ядра круглой или овальной формы, имеют 1—3 ядрышка и немногочисленные хроматиновые зерна. Цитоплазма хорошо окрашена, лишена включений, границы клеток четко выступают. На 8—11-ый день (рис. 2) картина резко меняется. Все поле зрения занято сплошным многослойм компактно прилегающих друг к другу вытянутых, крупных фибробластоподобных клеток, которые располагаются ориентированно, местами образуя потоки. Ядра средней величины, овальные, слабо окрашены и имеют четкие границы. Они расположены в центре клеток, имеют одно, реже два ядрышка и увеличенное число хроматиновых глыбок и зерен. Цитоплазма слабо окрашена к периферии и более интенсивно ближе к ядру. Клетки своими отростками как бы сливаются друг с другом, образуя синцитии. Строение цитоплазмы мелкозернистое, немногочисленные вакуоли обычно окружают ядро. Нередки включения эозинофильных глыбок, занимающих в некоторых клетках значительную часть цитоплазмы.

Наряду с фибробластоподобным типом клеток, занимающих подавляющую часть препарата, отмечены также клетки двух форм эпителиоподобного типа. Одна из них представляет собой отдельные неболь-

шие колонии плотно прилегающих друг к другу средней величины клеток. Обычно полигональные, с короткими отростками и невытянутым телом, они местами сливаются, образуя симпластоподобные структуры. Клетки эозинофильны, с яркими небольшими ядрами и интенсивно окрашенной



Рис. 2. А — фибробластоподобные. Б — эпителиоподобные клетки. 11-ый день культивирования. Фиксация Буэном, окраска гематоксилин-эозином, увеличение 10 $\times$ гомаль 4.

цитоплазмой. Для них характерны многочисленные вакуоли, располагающиеся преимущественно вокруг ядра и занимающие подчас большую часть клетки. Вторая форма эпителиоподобных клеток располагается большими полями и, в отличие от первой, встречается значительно реже. Сравнительно мелкие клетки располагаются сплошным моно-слоем, но благодаря слабой окраске периферийных частей клеток кажутся четко отграниченными друг от друга. Форма их, как правило, полигональная с короткими отростками и выраженным телом. Ядра округлые, ярко окрашены, имеют 2—3 ядрышка. Цитоплазма хорошо окрашена, однородна и не имеет включений. Последняя форма эпителиоподобных клеток идентична с описанной Г. Б. Юровской [3]. Обе формы эпителиоподобных клеток отмечены уже на 3—4-ый день культивирования.

Атипичные формы представлены редко встречающимися двоядерными и гигантскими клетками. Отмечено почкование ядра.

Встречаются клетки на разных стадиях митоза. Специального подсчета митозов нами не производилось.

Гибнущие клетки характеризуются эозинофильной окраской, увеличенным числом вакуолей и глыбчатых включений, распадом цитоплазмы. Уже на 18—20-ый день клетки подвергаются некрозу и отслаиваются от стекла, в то время как у Фестенстейна [7] при культивировании клеток печени эмбриона человека этот процесс происходит на 39-ый день. По-

видимому, видовая принадлежность оказывает значительное влияние на морфологию клеток *in vitro* несмотря на гомологичность исходной ткани. Данное предположение находит подтверждение в наблюдениях, указывающих на значительную разницу в морфологии культивируемых клеток печени кролика и клеток эмбриональной ткани печени курицы, кролика и крысы [1, 3, 14]. Морфологическая картина печеночной ткани в культуре носит весьма разнообразный характер, и нет никаких оснований говорить об общих чертах морфологии печеночной клетки вообще. В подтверждение сказанного можно привести некоторые факты. Питзурра [11] утверждает, что клетки печени мышинного зародыша на 20-ый день культивирования сплошь становятся эпителиоподобными. В то же время Пик [10] приводит данные, согласно которым появившиеся на первых стадиях культивирования эпителиоподобные клетки печени зародыша теленка на последующих стадиях превращаются в фибробластоподобные клетки. Культивируемые нами клетки печени 6-месячной курицы не имели ничего общего не только с клетками печени кролика, но и не походили на описанные Юровской [1] клетки печени зародыша цыпленка.

Таким образом, основными результатами проведенной работы можно считать следующее

Установлена возможность применения общепринятой методики трипсинизации и употребления синтетической среды 199 для выращивания клеток печени. Произведена попытка анализа морфологической картины клеток печени кролика *in vitro*. Отмечено наличие фибробластоподобных и эпителиоподобных клеток. Фибробластоподобный тип клеток характеризуется сильно вытянутыми, крупными, двух-четырёхотростковыми, а также веретеновидными клетками. Первые встречаются на препарате повсеместно и составляют основную массу монослоя. Вторые появляются редко и растут, образуя небольшие колонии. Эпителиоподобный тип клеток также состоит из двух форм. К первому отнесены нами клетки средней величины, плотно прилегающие друг к другу и имеющие многочисленные вакуоли. Они обычно имеют недлинные отростки, выраженное тело и располагаются небольшими колониями. Вторая форма характеризуется небольшой величиной и изолированностью клеток друг от друга. Эти клетки имеют короткие отростки и хорошо выраженное тело, но лишены вакуолей. Располагаются они большими, нечасто встречающимися полями.

Վ. է. ԼԵՈՆՈՎԻՉ

ՀԱԿԱՐԻ ԼՅԱՐԳԻ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՄԱՐՖՈԼՈԳԻԱՅԻ ՄԱՍԻՆ IN VITRO

Ա մ փ ո փ ու մ

Հոգվածում անալիզի է ենթարկվում ճաղարի լյարդի օր viro բջիջների մորֆոլոգիական պատկերը: Նշվում են էպիթելանման և ֆիբրոբլաստանման տիպեր: որոնցից տարաբանչուրը պարունակում է իրենց մորֆոլոգիայով տարրեր բջիջների երկուական ձև: Հաստնարհրվել են զգալի տարրերուժյուններ լյարդի մորֆոլոգիական պատկերի մեր և տարրեր հեղինակների կողմից բերված սովյալների միջև:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Асаио Кеньо. Окаяма икаккай дзасси, 75, 11—12, 981—989, 1963 (цитировано по РЖБ).
2. Какунами. Medicine, 15, 10, 787—789, 1958 (цитировано по РЖБ).
3. Юрская Г. Б. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2, 90—94, 1965.
4. Angelucci R., Clementi P. Boll. Soc. ital. biol. speriment., 38, 23, 119—1196, 1962 (цитировано по РЖБ).
5. Bang P. B., Watwick A. G. Liver. Cells and tissues cult., London—New York, Acad. Press, 607—630, 1965.
6. Carvey J. Nature, 191, 4792, 972—974, 1963.
7. Festenstein H. Nature, 199, 4897, 981—983, 1963.
8. Hebert S., Verne J. Bull. Assoc. anat., 116, 713—719, 1963.
9. Hills D., Bang B. Exptl. Cell. Res., 26, 1, 9—36, 1962.
10. Pleck A. C., Kuiper Ch. M. Experientia, 17, 3, 115—116, 1961.
11. Pizzurra M., Costabile F., Santacrose G., Roberti D. Nuovi ann. igiene e microbiol., 15, 5, 135—141, 1964 (цитировано по РЖБ).
12. Prydz H., Jonsen J. Scand. J. Clin. and Lab. Invest., 16, 3, 300—306, 1964.
13. Sandström B. Swedish Cancer Soc. Year Book 1960—1962, 189—491, 1963 (цитировано по РЖБ).
14. Sandström B. Acta Soc. med. upsaliensis, 69, 5—6, 209—211, 1961 (цитировано по РЖБ).
15. Verne J., Hebert S. Diabete, 13, 1, 2—7, 1965 (цитировано по РЖБ).