

Г. Г. БАТИКЯН, В. С. ПОГОСЯН, Н. К. ХАЧАТРЯН

ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ ПОЧЕЧНЫХ КЛЕТОК ЭМБРИОНА СВИНЕЙ

Культивирование изолированных клеток на искусственных питательных средах открыло новые возможности в генетике соматических клеток млекопитающих и человека, позволяющие выявлять закономерности генетической дифференцировки клеток, мутагенеза и ряд других вопросов.

За последние годы работы по выведению перевиваемых клеточных линий как злокачественных новообразований, так и нормальных клеток фибробластического и эпителиального типа, значительно расширились, что создало предпосылки для решения многих теоретических и практических вопросов.

Изучение поведения ядер в клетках крысиных фибробластов [12, 13], клеточных популяций китайского хомячка [5, 6], нормальных и злокачественных клеток человека [15], почечных клеток обезьян [3, 4], крупного рогатого скота [14], поросят и эмбриона свиньи [2], а также взрослого барана [1], показывает, что при выращивании клеток на питательных средах наблюдается появление многоядерности, гаплоидных и полиплоидных ядер, клеток с хромосомными перестройками.

Культура почечной ткани свиного эмбриона почти не служила объектом цитологического изучения, за исключением некоторых работ по кариометрии [2, 7, 16]. Задача настоящей работы—цитологическое изучение перевиваемой культуры изолированных почечных клеток эмбриона свиней, нашедшей применение в вирусологических работах.

Материал и методика. Исследуемый штамм почечных клеток эмбриона свиней был введен в культуру 26.IV.1964 г. сотрудниками отдела болезней свиней и птиц вирусологической лаборатории Научно-исследовательского института животноводства и ветеринарии АрмССР. А. Б. Хачатрян и А. А. Погосяном. Первичная культура пассировалась на синтетической среде Хенкса с 0,5% гидролизатом лактальбумина и 10% сывороткой крупного рогатого скота, после чего была переведена на среду Игла с 10% сывороткой крупного рогатого скота и выращивалась в термостате при $t + 36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$. Пассирование производилось через каждые 7—8 дней. При цитологических исследованиях были взяты клетки 46, 52, 54 и 65-го пассажей после пересева на среде Игла.

Для получения четкой картины изменения культуры в пассаже на

1—8-ые сутки провели фиксацию клеток, растущих на покровных стеклах в смеси спирт—уксусная кислота (3 : 1), и окрашивали 1% ацетоорсеином. В каждом пассаже и на каждый срок фиксации для вычисления ядерно-плазменного отношения измеряли не менее 100 клеток и ядер. Для вычисления митотического индекса подсчитывали до 8000 клеток, а для определения аберраций хромосом—312 анафаз.

Исследование хромосомного набора культуры производили на метафазных пластинках. Препараты готовили по обычной методике с применением колхицина и гипотонического раствора, окрашивали их 1,5% раствором орсеина. Подсчитали 357 метафаз.

При сопоставлении данных по исследуемому материалу оказалось, что клетки четырех пассажей показали близкие результаты. Эти данные будут изложены вместе.

Экспериментальная часть. Перевиваемая почечная культура свиного эмбриона имеет эпителиеподобные, слегка удлинённые, многогранные клетки, с крупными округлыми ядрами, которые нередко содержат по 1—4 ядрышка. Встречаются также клетки с 2—4 ядрами (рис. 2). Рост клеток в культуре происходит отдельными островками. Клетки в островке лежат компактными группами. Отмечаются и отдельные клетки с крупными округлыми ядрами, цитоплазма которых образует в определенных направлениях потоки, с преобладанием двухотростной веретенообразной формы клеток. На 2—3-й сутки культивирования наблюдается значительно более энергичная пролиферация островковых клеток по сравнению с единичными, в результате чего островковые клетки заполняют почти всю площадь препарата (рис. 1). При этом единичные клетки сближаются, и отростки их значительно укорачиваются. После образования сплошного клеточного слоя на стекле (4—5-е сутки) островковые клетки занимают свыше 85% площади препарата, и культура в целом приобретает большое сходство с однослойной почечной культурой ткани обезьян. Массовая гибель клеток в культуре начинается после 8 суток.

После пересева на свежую питательную среду в течение первых суток клетки—слегка овальные, средний размер их от 1,00 до 1,32 μ , средний размер ядер 0,42 μ .

Часть клеток при пересеве на свежую питательную среду через 20 часов начинает активно делиться. Митотический индекс уже с первых суток культивирования повышается. В течение 3—5 суток после версенизации клеток (период становления клеточного слоя) митотическая активность культуры постепенно нарастает. Средний размер клеток и ядер немного уменьшается, что связано с интенсивным делением и увеличением роли мелких клеток в популяции (табл. 1). Таким образом, после пересадки на свежую питательную среду в течение 20 часов наблюдается латентный период в развитии почечных клеток культуры эмбриона свиней.

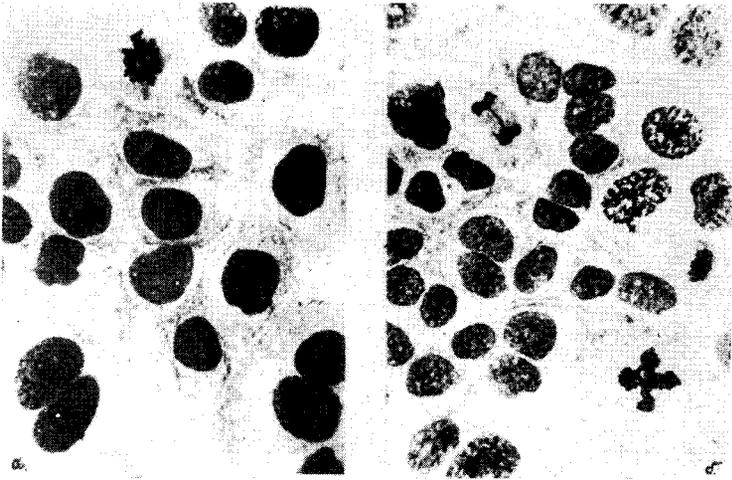


Рис. 1. Общий вид культуры поперечных клеток эмбриона свиней: а — культура 46 пассажа на 2-ые сутки культивирования; б — культура 65 пассажа на 3-и сутки культивирования с нарушениями (мост, многополюсный митоз).

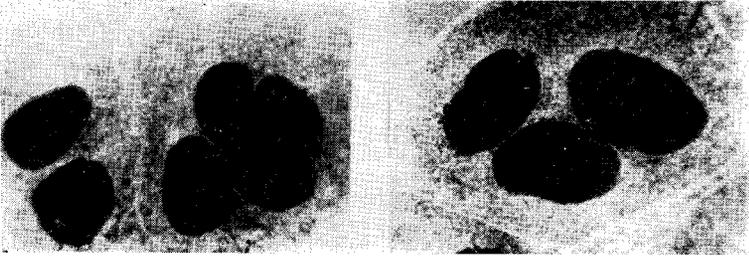


Рис. 2. Почечные клетки культуры эмбриона свиней с 2—4 ядрами.

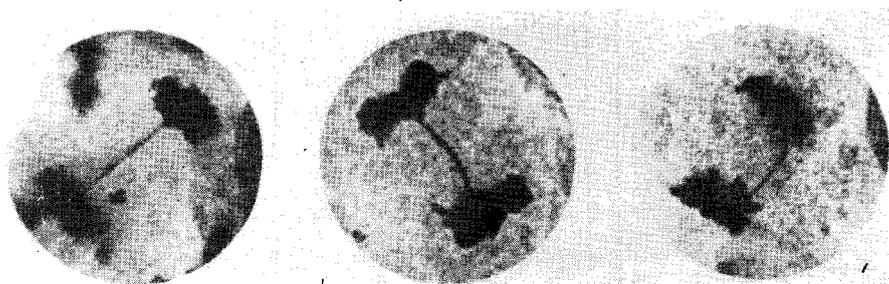


Рис 4. Одиночные мосты в культуре почечных клеток эмбриона свиней.

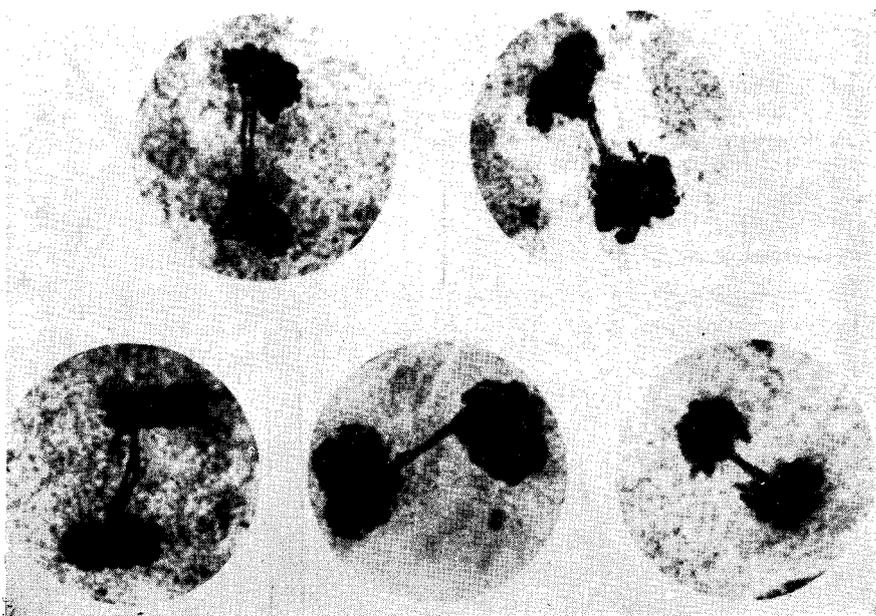


Рис. 5. Парные мосты в культуре почечных клеток эмбриона свиней.

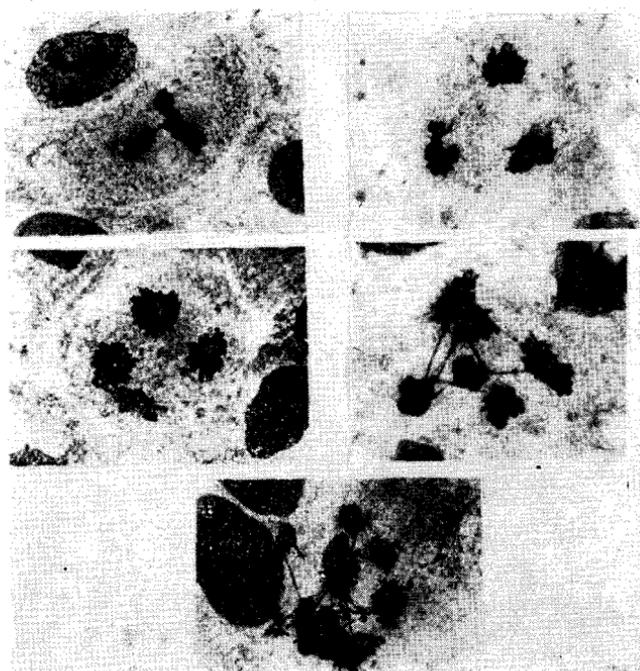


Рис. 6. Многополюсные митозы в культуре почечных клеток эмбриона свиней.

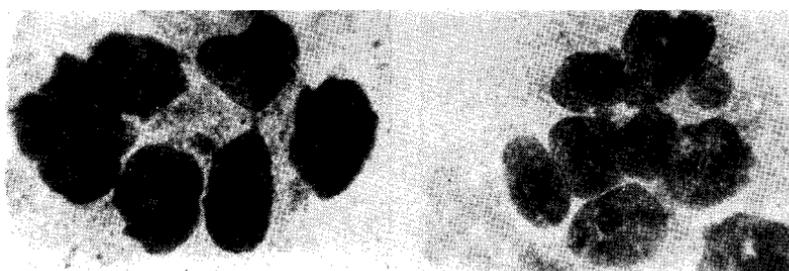


Рис. 7. Фигуры амитотического деления в культуре почечных клеток свиней.

Таблица 1
Средний размер клеток и ядер культуры почечных клеток эмбриона свиней

Возраст культуры в днях	Средний размер клеток в мк	Средний размер ядер мк
1	$1,32 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,01$
2	$1,33 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,02$
3	$1,06 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,03$
4	$1,02 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,03$
5	$0,98 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,02$
6	$0,81 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,02$
7	$0,72 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,01$
8	$0,67 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,02$

После образования на стекле сплошного пласта клеток, размеры ядер стабилизируются, несмотря на уменьшение размеров клеток.

Начиная с 3-их суток наблюдается подъем митотической активности (рис. 3); митотический индекс становится максимум равным $4,5\% \pm 0,15$.

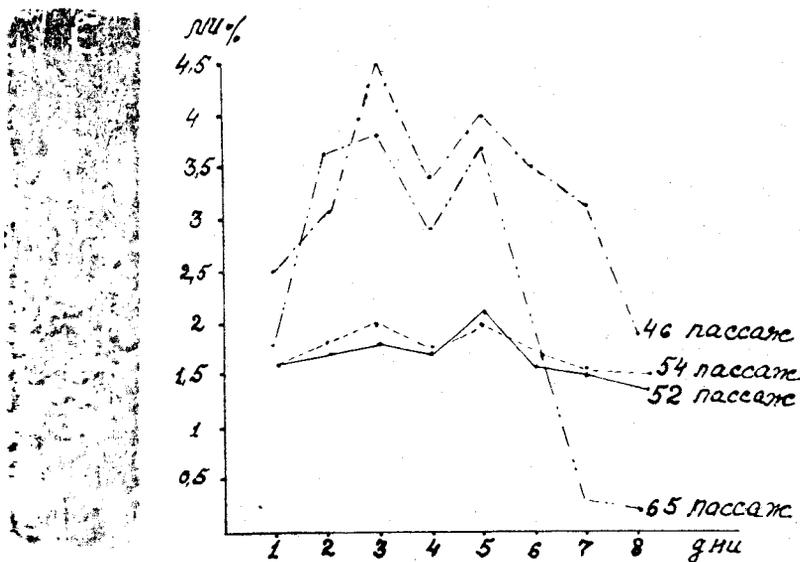
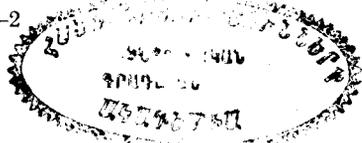


Рис. 3. Митотический индекс в культуре почечных клеток эмбриона свиней.

На 4-ые сутки отмечается небольшой спад митотической активности, несмотря на продолжение уменьшения размеров клеток, на следующие сутки — новый подъем.

Начиная с 6-ых суток резко снижается митотическая активность. Митотический индекс уже на 7—8 сутки культивирования находится ниже уровня первых суток инкубации (рис. 3), а средние размеры ядер и клеток становятся неустойчивыми, в зависимости от преобладания явлений функционального сморщивания клеток и ядер, ввиду чего те и другие могут оказаться либо уменьшенными, либо увеличенными.

В экспериментальных работах по генетике очень важно определить естественную мутабельность изучаемого материала. В данном случае критерием мутабельности послужило образование аберраций хромосом.



в почечных клетках культуры эмбриона свиней. Анализ анафаз показал высокую частоту клеток с абберациями хромосом, среди которых большая часть связана с транслокациями. Почти все наблюдаемые мосты (97%) были без фрагментов (табл. 2). Обнаружены как одиночные, так

Таблица 2
Типы аббераций в клетках почечной культуры эмбриона свиней

Типы аббераций	% аббераций
Хроматидные мосты с фрагментами	3
Хроматидные мосты	67
Хромосомные мосты	30

и парные мосты, параллельные и перекрестные (рис. 4, 5). Кроме описанных хромосомных аббераций, в культуре наблюдаются также и многополюсные митозы. Отмечены образования от 3—7 полюсов (рис. 6). Возникает предположение, что наличие неправильных митозов характеризует интенсивный обмен веществ в культуре клеток, однако независимо от механизма возникновения неправильных митозов, сам факт существования может и должен служить критерием состояния культуры, всегда указывающим на значительное нарушение нормальной ее жизнедеятельности. Свидетельством тому служат данные, показывающие возрастание процента анафазных аббераций и многополюсных митозов в последующих пассажах (рис. 8). С появлением многополюсных митозов, полюса которых могут быть присоединены, в клетках наблюдается появление фигуры амитотического деления, а также ядерный полиморфизм. В одной клетке образуются разные по форме и размерам ядра (рис. 7).

При длительном культивировании вне организма клетки млекопитающих могут кариологически изменяться, трансформируясь из диплоидных в гетероплоидные [21, 28, 30, 31]. Выявлено, что для почечных клеток перевиваемой культуры эмбриона свиней характерна отчетливо выраженная модальная зона между наборами 37 и 41 хромосомы, то есть в околодиплоидной области (рис. 9). Здесь сосредоточено 40—43% метафаз. Гипердиплоиды составляют 33—38%, а гиподиплоиды 9—13% (рис. 10). Однако количество хромосом в метафазах колеблется в пределах от 30 до 150. Уменьшение или увеличение числа хромосом в околодиплоидных клетках происходит, в основном, за счет утраты или увеличения средних и мелких хромосом, что приводит к появлению новых структурных вариантов. В поздних пассажах происходит сдвиг модального класса клеток в сторону гипердиплоидного числа хромосом. В 65-ом пассаже возрастает степень гетероплоидии клеточной популяции. Наряду

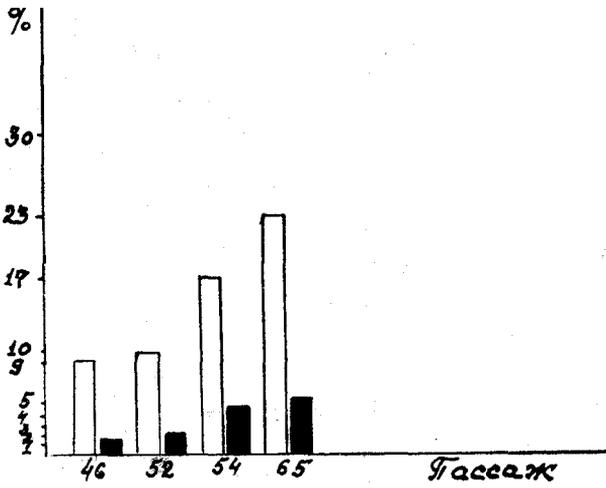


Рис. 8. Хромосомные нарушения и многополюсные митозы в последующих пассажах культуры почечных клеток эмбриона свиней. □ — хромосомные нарушения, ■ — многополюсные митозы.

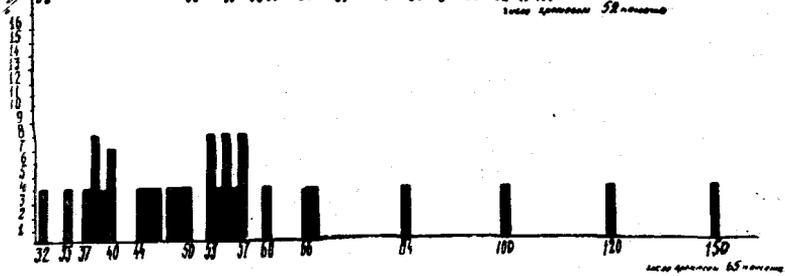
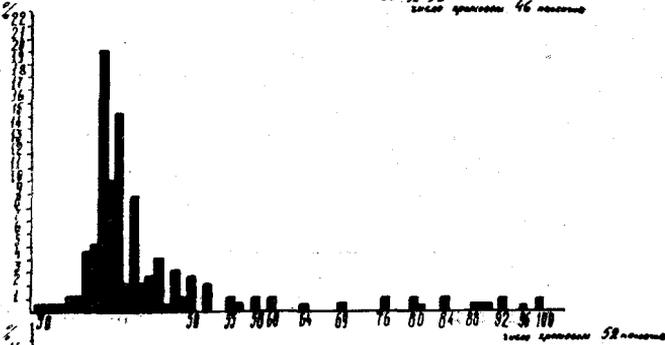
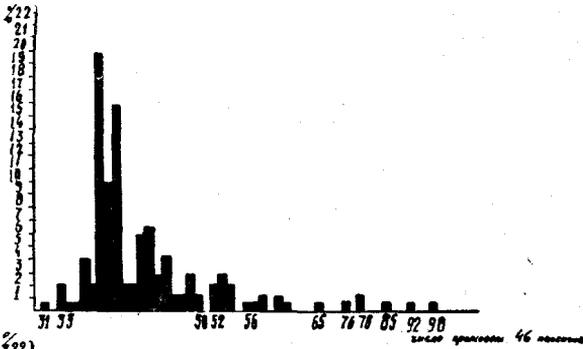


Рис. 9. Гистограмма распределения чисел хромосом в популяции почечных клеток культуры эмбриона свиней.

с тетраплоидными наборами выделяются и септаploидные клетки—4% (рис. 9).



Рис. 10. Метафазные пластинки в популяции культуры почечных клеток эмбриона свиней: а — диплоидный набор ($2n = 40$); б — гипердиплоидный набор ($2n + 7$); в — гиподиплоидный набор ($2n - 10$).

Обсуждение. При цитологическом исследовании культуры почечных клеток эмбриона свиней обнаружены определенные закономерности. Характерным для данной культуры и отличающим ее от первичноэксплантируемых почечных является второй пик митотической активности.

Перевиваемая культура почечных клеток эмбриона свиней отличается своим полиморфизмом и значительной величиной клеток, в некоторых случаях достигающих гигантских размеров. В цитоплазме многих гигантских клеток наблюдается большое число ядер (до 5—8), что, по-видимому, является результатом многополюсных митозов.

В литературе имеется сравнительно немного сообщений об адаптации почечных клеток некоторых видов животных к условиям непрерывного пассирования [1, 8, 18, 20, 25, 26, 27]. Получение перевиваемых клеточных линий из нормальных тканей животных часто связывают с трансформацией клеток, в результате которой они приобретают способность бесконечно пассироваться *in vitro* [17, 29, 33]. Однако мнения о характере этих изменений расходятся. Точка зрения, по которой в основе трансформации клеток может лежать их малигнизация, подвергается оживленному обсуждению [17, 28, 31]. Корриел и сотрудники [17] полагают, что, хотя по ряду признаков (быстрота размножения, аномалии хромо-

сомного аппарата, полиморфизм и др.) перевиваемые клетки сходны с клетками злокачественного типа, это еще не дает основания считать их малигнизированными. Однако полученные факты подтверждают предположение, что длительно культивируемые клетки нормальных тканей подвергаются глубоким изменениям вследствие адаптационной селекции, обусловленной специальными условиями жизни *in vitro*, которые и способствуют образованию многоядерности. Как показано в работах Сидорова и Соколова [9, 10], многоядерность является следствием перемещения и разброса хромосом в клетке во время к-митоза благодаря отсутствию организующего механизма веретена в мета- и анафазах. Вследствие блокады веретена хромосомы располагаются в клетке случайно, что и в дальнейшем определяет форму покоящегося ядра. В результате, можно наблюдать соответствие между формой покоящегося ядра и расположением хромосом в метафазе. Отсюда следует, что наблюдаемые амитотические фигуры покоящегося ядра представляют собой лишь одну из ступеней в перемещении хромосом, ведущих от одного шарообразного ядра через полиморфизм к многоядерности. Таким образом, параллельно увеличению плоидности возникают полиморфные ядра тем более сложной формы, чем выше полиплоидия. Для клеточных популяций *in vitro* [19, 21, 22, 24] характерна также постоянная и непрекращающаяся изменчивость кариотипа. Анеуплоидия в кариотипе возникает в результате хромосомной изменчивости. Известно, что нерасхождение хромосом в митозе чаще затрагивает мелкие хромосомы, чем крупные [15]. Уменьшение числа хромосом в гиподиплоидах и увеличение в гипердиплоидах осуществляется именно путем утраты или прибавления более мелких элементов. Однако в какой мере указанные морфологические изменения можно рассматривать как свидетельство малигнизации почечных клеток культуры эмбрионов свиней, пока трудно сказать. Многополюсные митозы наблюдаются и у нормальных клеток [33]. Полиплоидные клетки отмечены во всех длительно культивируемых штаммах [11, 23, 32].

В ы в о д ы

1. Почечная культура эмбриона свиней принадлежит к типу эпителиеподобных клеточных культур и характеризуется как анеуплоидная культура с выраженной модальной зоной в околодиплоидной области, а также высоким уровнем аберрации хромосом.

2. Почечные клетки эмбрионов свиней отличаются от линий раковых клеток относительно невысокой метаболической активностью и более длительной сохраняемостью культур. Последнее свойство имеет немаловажное значение при использовании данной культуры для культивирования и титрирования вирусов, постановки опытов, нейтрализации и т. д.

Հ. Գ. ԲԱՏԻԿՅԱՆ, Վ. Ս. ՊՈԳՈՍՅԱՆ, Ն. Կ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

ԽՈՉԻ ԷՄԲՐԻՈՆԻ ԵՐԻԿԱՄԱՄԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՅԻ ԲԶՋԱԲԱՆԱԿԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Մեր նպատակն է եղել ուսումնասիրել խոզի էմբրիոնի երիկամային բջիջների վերատին աճող կուլտուրայում տեղի ունեցող բջջաբանական փոփոխությունները, կուլտուրա, որը մեծ հետաքրքրություն է ներկայացնում վիրուսաբանության, բջջաբանության և բիոթեմիայի ասպարեզում կատարվող հետազոտությունների համար:

Ուսումնասիրության համար ընտրվել են 46-րդ, 52-րդ, 54-րդ և 65-րդ սերունդների բջիջները: Պարզվում է, որ խոզի էմբրիոնի երիկամային բջիջների վերատին աճող կուլտուրան բնորոշ է իր էպիթելանման, թեթևակի երկարացած, բազմանկյուն բջիջներով, խոշոր և կլորավուն կորիզներով: Բջիջներ միջինում ունեն 1,00—1.32 մկ մեծություն, իսկ կորիզները՝ 0.42 մկ: Կուլտուրայում բջիջների աճը տեղի է ունենում զազուլիներով: Բջիջների մի մասը մշակման առաջին իսկ օրից կպչելով ապակուն, սկսում են ակտիվ կերպով բաժանվել:

Բջիջների բաժանման միտոտիկ ինդեքսը հասնում է մաքսիմումի մշակման 3-րդ և 5-րդ օրերին: Ուսումնասիրվող կուլտուրան բնորոշ է քրոմոսոմային աբերացիաների բարձր հաճախականությամբ: Դրանք հիմնականում (91%) անաֆազային կամրջակներ են: Հանդիպում են նաև բազմաբևեռ (3—7 բևեռ) միտոզներ:

Մետաֆազային թիթեղներում քրոմոսոմների թվի հաշվառման հիման վրա խոզի էմբրիոնի երիկամային բջիջների վերատին աճող կուլտուրան կարելի է բնորոշել որպես անեուպլոիդ կուլտուրա: Քրոմոսոմների մոդալ թիվը մոտ է դիպլոիդ հավաքին (38—40), մինչդեռ ընդհանուր առմամբ նրանց թիվը տատանվում է 30—150-ի սահմաններում:

Ներկայումս դժվար է ասել, որ խոզի էմբրիոնի երիկամային բջիջներում նշված մորֆոլոգիական փոփոխությունները մալիգնազացման արդյունք են, քանի որ բազմաբևեռ միտոզների, բազմակորիզայնության երևույթներ դիտված են նաև նորմալ բջիջներում:

Ուսումնասիրվող կուլտուրան տարբեբովում է չարորակ ծագում ունեցող բջջային կուլտուրաներից, հիմնականում, համեմատաբար ոչ բարձր մետաբոլիկ ակտիվությամբ և առավել երկար պահուստակուլությամբ: Վերջին հատկանիշը մեծ նշանակություն ունի վիրուսների մշակման, նրանց տիտրման և չեզոքացման փորձերում տվյալ կուլտուրայի կիրառման համար:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гаврилов В. И. Вопросы вирусологии, 1, 88, 1960.
2. Жестерев В. И., Сергеев В. А., Сушков Ф. В., Качанова С. П. Докл. ВАСХНИЛ, 11, 35, 1965.
3. Залкинд С. Я. и Степанова Л. Г. Бюлл. exper. биол. мед. 47, 6; 110, 1959.
4. Заславский В. Г. Тр. Ин-та препаратов против полиомиелита, т. I, 385, 1959.

5. Захаров Н. Ф., Какпакова Е. С., Еголина Н. А. Цитология, 8, 2, 193, 1966.
6. Какпакова Е. С. Генетика, 5; 47, 1966.
7. Осидзе Н. Г., Сергеев В. А., Сушков Ф. В. Ветеринария, 10; 10, 1964.
8. Сергеев В. А. Цитология, 5, 1; 104, 1963.
9. Сидоров Б. Н. и Соколов Н. Н. Булл. МОИП отд. биол., 68, 5; 78, 1963.
10. Сидоров Б. Н. и Соколов Н. Н. Цитология, 6, 5, 645, 1965.
11. Староверова Н. С. Тезисы докл. IV итоговой научной конф. Ин-та экспер. и клинич. онкологии АМН СССР, М., 86, 1961.
12. Староверова Н. С. Вопросы онкологии, 7, 4, 31, 1961.
13. Староверова Н. С. Вопросы онкологии, 7, 9, 3, 1961.
14. Сушков Ф. В., Сергеев В. А. Вопросы ветеринарной вирусологии, т. I, 25, 1964.
15. У Минь. Цитология 4, 3, 281, 1962.
16. Хесин Я. Е., Сушков Ф. В., Митин Н. И. Цитология, 5, 1, 43, 1963.
17. Coriell L., McAllister R., Greene A., Flagg W., Tall M. L., Wagner B. J. *immunol.*, 80, 2, 142, 1958.
18. De Brion G. L., Guest J. *Ann. inst. Pasteur*, 92, 426, 1957.
19. Ford D. K., Boguszewski C., Auersperg N., *J. Nat. Cancer inst.*, 26, 691, 1961.
20. Greig A., *Canad. J. Microbiol.*, 4, 487, 1958.
21. Hsu T. C., Moorhead P. S. *J. Nat. Cancer inst.*, 18, 3, 463, 1957.
22. Hsu T. C. Numerical variation of chromosomes in higher animal. In *Development of Cytology*. № 4. Ronald Press Co., 47, 1959.
23. Hsu T. C. and Klatt O. *J. Nat. Cancer inst.*, 22, 313, 1959.
24. Hsu T. C., Merchant D. J. *J. Nat. Cancer inst.*, 26, 1075, 1961.
25. Madin S. L., Darby N. *Proc. Soc. Exper. Biol. a Med.*, 98, 574, 1958.
26. McCarthy F. L., Tytell A. *Feder. Proc.* 17, 1, 525, 1958.
27. McClain M. L., Hackett A. *Feder. Proc.* 17, 526, 1958.
28. Moore A., Southam C. L., Sternberg S. *Science* 124, 32, 127, 3212, 1956.
29. Morgan J. *Bacter. Reviews*, 22, 1, 20, 1958.
30. Nakanishi Y. H., Fernandes M. V., Mirutani M. and Pomerat C. M. *Texas Reports on Biol. and Med.*, 17, 3, 345, 1959.
31. Nakanishi Y. H. *Zeitschrift für Zellforschung*. 51, 138, 1960.
32. Takaska T. and Katsuta H. *Japan. J. exper. med.*, 28, 115, 1958.
33. Westwood J., Macpherson J. L., Titmus D. *Brit. J. Exper. Path.* 38, 2, 138, 1957.