

УДК 615, 371, 576, 311

Изменение цитологических показателей перевиваемой Т-лимфобластоидной линии клеток МТ-4 в процессе культивирования

**Л.О. Аброян, Л.А. Акопян, А.С. Аветисян,
Е.М. Каралова**

*Институт молекулярной биологии НАН РА
0044, Ереван, ул. Асратяна, 7*

Ключевые слова: культура клеток МТ-4, ядро, ядрышко, ДНК, цитофотометрия

Методами цитоморфометрии и сканирующей цитофотометрии телевизионным способом исследовали изменения в клетках перевивной лимфобластоидной линии МТ-4 в течение четырех суток культивирования. В суспензионной культуре определяли процент мертвых клеток, митотический коэффициент, площадь и периметр ядер, среднее число ядрышек в ядрах и распределение ядер по числу ядрышек в них. Измеряли массу ДНК в ядрах, выясняли распределение ядер по плоидности и соотношение эуплоидных и анеуплоидных клеток.

Оказалось, что клетки в процессе культивирования активно пролиферируют, медленно повышается количество мертвых клеток, резко уменьшается среднее число ядрышек в ядрах, а к четвертым суткам культивирования в подавляющем числе ядер ядрышки отсутствуют. Среднее содержание ДНК в ядрах клеток МТ-4 в первые сутки культивирования колеблется в пределах околотетраплоидного количества, затем значительно повышается и вновь падает до околодиплоидного количества, а процент эуплоидных клеток на всем протяжении исследования, исключая вторые сутки, выше числа анеуплоидных и к четвертым суткам достигает 75% популяции, что приводит к положительному балансу плоидности и вместе с уменьшением индекса накопления ДНК свидетельствует о том, что при культивировании, в основном, выживают эуплоидные клетки.

Изучению степени активности ядер в механизмах регуляции пролиферации и дифференцировки клеток посвящено много работ [1,2,6,11,17], а в последние годы особое внимание уделяется морфофункциональному состоянию ядер и ядрышек в процессе развития клеточных популяций. Показано, например, что размер, форма, количество и суммарная площадь ядрышек интерфазных ядер корре-

лируют с пролиферативными показателями, уровнем дифференцировки нормальных, поврежденных и опухолевых клеток и содержанием белка в них [4,9-11]. Перспективны исследования функциональной морфологии ядрышкообразующих районов хромосом и интерфазных ядер, проводимые как *in vivo* на нормальных и злокачественно измененных клетках [14,15], так и *in vitro*, в частности, на перевивных культурах трансформированных клеток [2,3,8]. Ранее нами было проведено цитологическое исследование поведения клеток перевивных культур фибробластов мышей NIH 3T3 [12] и показано, что эуплоидные ядра клеток NIH 3T3 содержат от одного до трех ядрышек и не зависят от сроков культивирования. Исходя из этого, было интересно исследовать поведение ядер и ядрышек суспензионной культуры МТ-4 на разных сроках культивирования. В доступной нам литературе подобные сведения не были обнаружены.

Настоящее исследование посвящено выявлению и анализу изменений в поведении ядер и ядрышек клеток перевивной лимфобластоидной линии МТ-4 динамики содержания ДНК в ядрах, изменений их размеров, пролиферативной активности клеток и определению соотношения эу- и анеуплоидных клеток в течение культивирования.

Материал и методы

Клетки перевивной лимфобластоидной линии МТ-4 выращивали в культуральных флаконах в среде RPMI – 1640 с 15% эмбриональной бычьей сывороткой. Пробы клеток брали ежедневно в течение 4 дней. Суспензию клеток трижды отмывали бессывороточной средой путем центрифугирования, осаждали на предметные стекла и фиксировали в 96% этиловом спирте в течение 30 мин. Для выявления ДНК препараты окрашивали фуксином по Фельгену (гидролиз в 5 Н HCl при 22° С в течение 60 мин). Определяли число мертвых клеток, митотический коэффициент и среднее число ядрышек в ядре. С помощью анализатора изображений методом телевизионного сканирования (об. 100/1, 30) в ядрах измеряли массу ДНК (= 575 нм) в единицах плоидности (с), площадь и периметр [6]. Вычисляли распределение ядер по числу ядрышек в них и распределение клеток культуры по плоидности (в %). Определяли соотношение эу- и анеуплоидных клеток. В качестве эталона ДНК использовали лимфоциты крови доноров. Значения исследованных параметров выражали в условных единицах. Достоверность различий средних значений оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, число митозов в течение трех суток достоверно (более чем в 2 раза) увеличивается, а к четвертым суткам резко уменьшается. Количество мертвых клеток, достаточно высокое с первых суток культивирования, держится на этом уровне в течение трех суток, а на четвертые сутки более чем в 2 раза увеличивается. Среднее число ядрышек на клетку по мере культивирования уменьшается и к четвертым суткам их число в 5 раз уменьшается по сравнению с первыми сутками. Меняется также распределение ядер по числу ядрышек в них. Основную массу клеток составляют безъядрышковые ядра (от 63% в первые сутки культивирования до 90% на четвертые сутки). Наименьшее число составляют двуядрышковые клетки, количество которых постепенно уменьшается и к четвертым суткам полностью исчезает (рис.1).

Таблица 1

Процент митозов, мертвых клеток и среднего числа ядрышек в суспензионной культуре лимфобластоидных клеток МТ-4 в течение четырех суток культивирования

Время культивирования	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки	4-е сутки
Число митозов, %	1.1 ± 0.08	2.2 ± 0.3	2.4 ± 0.2	0.7 ± 0.06
Мертвые клетки, %	13.1 ± 0.2	9.0 ± 0.1	8.8 ± 0.1	26.3 ± 2.2
Ср. число ядрышек	0.51	0.26	0.14	0.10

Площадь ядер клеток МТ-4 в процессе трех суток культивирования недостоверно увеличивается, а к четвертым суткам достоверно ($p < 0.001$) уменьшается. Примерно та же тенденция наблюдается и в отношении периметра ядер. При этом отношение периметра ядер к их площади возрастает от 0.34 до 0.38, что свидетельствует о повышении физиологической активности популяции в процессе культивирования и совпадает с литературными данными [11]. Содержание ДНК в ядрах клеток в первые двое суток колеблется вокруг тетраплоидного количества, что совпадает с кариологическим анализом, выявившим модальное число хромосом равное 80-85 [4], затем резко падает и на третьи и четвертые сутки не превышает околотриплоидного количества, что четко коррелирует с распределением ядер по пloidности (рис.2).

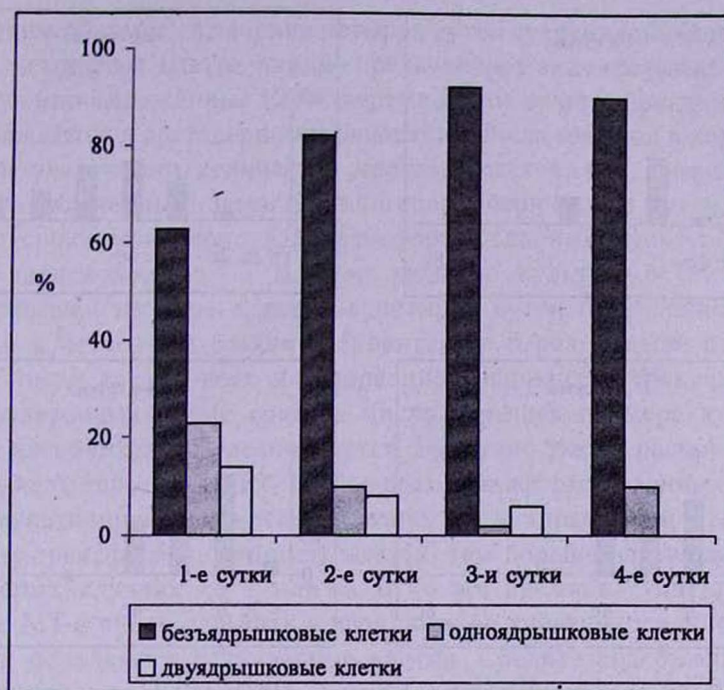


Рис. 1. Распределение ядер клеток культуры МТ-4 по числу ядрышек в них (%)

Таблица 2

Содержание ДНК (с), площадь и периметр лимфобластоидных клеток линии МТ-4 в течение четырех суток культивирования

Время культивирования	1-и сутки	2-и сутки	3-и сутки	4-е сутки
ДНК (с)	3.5	3.6	2.7	2.6
Площадь	47.3±2.0	49.5± 4.1	48.1±2.7	37.8±2.9
Периметр	16.3±0.4	18.1 ± 0.5	17.3± 0.4	14.5±0.6

Популяция клеток МТ-4, в основном, представлена ди- и тетраплоидными ядрами, и только на вторые сутки культивирования появляются клетки с более высоким содержанием ДНК.

В первые двое суток культивирования число диплоидных клеток в популяции не превышает 4%, а затем оно резко возрастает и к четвертым суткам составляет около двух третей популяции. Уменьшается также количество анеуплоидных клеток, которые на третьи и четвертые сутки представлены триплоидными ядрами с «промежуточными» значениями количества ДНК, процент которых в

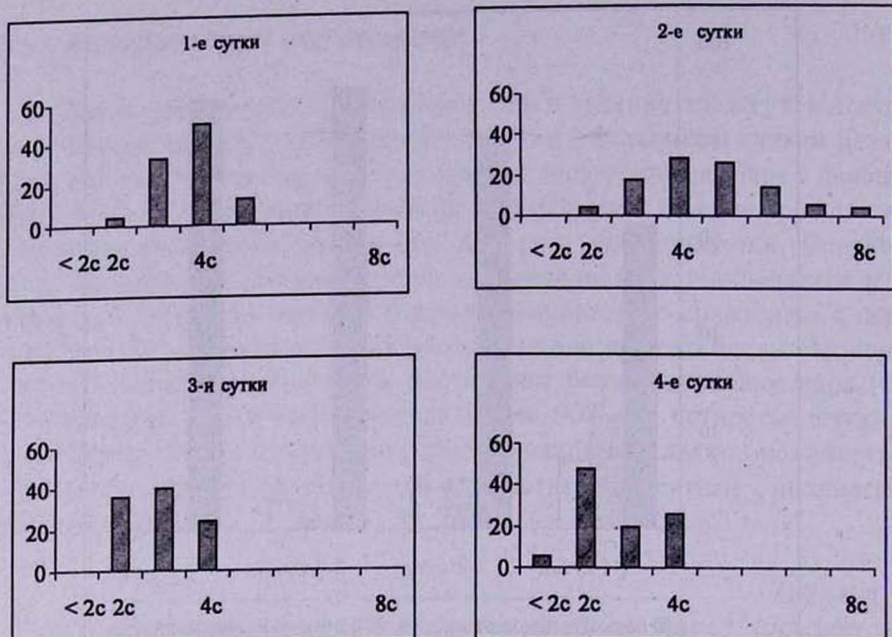


Рис. 2. Распределение клеток культуры МТ-4 по плоидности в течение четырех суток культивирования

популяции на четвертые сутки не превышает 20% и, скорее всего, обусловлен прохождением клетками митотического цикла, в силу чего происходит резкое, примерно в два раза, уменьшение числа тетраплоидных и полное исчезновение октаплоидных клеток. Вследствие этого баланс плоидности ДНК (табл.3) на вторые сутки отрицательный, а во всех остальных случаях положительный, что свидетельствует о превышении процента эуплоидных клеток в популяции над анеуплоидными. Индекс накопления ДНК свидетельствует об уменьшении его содержания в ядрах клеток трех- и четырехсуточной культуры примерно на одну треть.

Таблица 3

Динамика индекса накопления ДНК и баланса плоидности лимфобластоидных клеток линии МТ-4 в течение четырех суток культивирования

Время культивирования	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки	4-е сутки
Индекс накопления ДНК	3.42	5.18	2.88	2.66
Баланс плоидности	44	- 302	48	134

Таким образом, в течение четырех суток суспензионная культура лимфобластоидных клеток линии претерпевает значительные изменения, особенно выраженные на четвертые сутки культивирования, которые выражаются в достоверном уменьшении числа митозов в популяции клеток и увеличении количества мертвых клеток, что согласуется с данными, полученными нами при многопараметрическом исследовании в те же сроки монослоя ряда трансформированных культур человеческого происхождения [7]. В то же время в культуре МТ-4 среднее число ядрышек на ядро в течение четырех суток постепенно уменьшается и к четвертым суткам становится в 5 раз меньше исходных данных, тогда как во всех исследованных вариантах трансформированных клеточных линий среднее число ядрышек по мере культивирования незначительно увеличивается. Различно также распределение ядер по числу ядрышек в них. Так, во всех трансформированных линиях в ходе культивирования число ядрышек увеличивается, и чем более выражена трансформированность клеток, тем больше ядрышек в ядре, в некоторых случаях до 4 или 5. В то же время в суспензионной культуре МТ-4 число ядрышек в ядре по мере культивирования уменьшается и появляются безъядерные клетки. Среднее содержание ДНК в трансформированных культурах гепатокарциномы, аденокарциномы толстого отдела кишечника, рака гортани и эмбриональной почки в течение четырех суток культивирования постепенно уменьшается, но при этом остается в пределах околотетраплоидного количества, в то время как среднее содержание ДНК в ядрах суспензионной культуры клеток МТ-4 в первые сутки колеблется вокруг тетраплоидного количества, а затем, постепенно уменьшаясь, к четвертым суткам достигает околодиплоидного количества. При этом процент эуплоидных клеток в этих культурах не превышает 40% популяции, в то время как в культуре клеток МТ-4 процент эуплоидных клеток на всем протяжении исследования, исключая вторые сутки, выше числа анеуплоидных и к четвертым суткам достигает 75% популяции, что приводит к положительному балансу плоидности и вместе с уменьшением индекса накопления ДНК свидетельствует о том, что при культивировании, в основном, выживают эуплоидные клетки.

Поступила 04.02.08

US-4 շարունակական S-լինֆորլաստոիդ բջիջների բջջաբանական ցուցանիշների փոփոխությունները կուլտիվացման ընթացքում

Լ.Օ. Աբրոյան, Լ.Հ. Հակոբյան, Ա.Ս. Ավետիսյան,
Ե.Մ. Կարալովա

Ցույց է տրված, որ կուլտիվացման ընթացքում տեղի է ունենում US-4 լինֆորլաստոիդ գծի պրոլիֆերատիվ ակտիվության և բջիջների կորիզներում կորիզակների միջին թվի նվազում և կուլտիվացման վերջում հայտնաբերվում են առանց կորիզակի բջիջներ, բարձրանում է մեռած բջիջների տոկոսը: Առաջին օրը կորիզներում ԴՆԹ-ի միջին պարունակությունը տատանվում է տետրապլոիդ քանակի շրջանակներում, ապա՝ աստիճանաբար նվազելով, չորրորդ օրվա ընթացքում իջնում է մինչև դիպլոիդ քանակը: Նույն ժամանակահատվածում էուպլոիդ բջիջների տոկոսը հասնում է պոպուլյացիայի 75%-ի:

Այս ամենը, ինչպես նաև ԴՆԹ-ի կուտակման ինդեքսի և կորիզակների միջին թվի նվազումը, վկայում են, որ կուլտիվացման ընթացքում հիմնականում կենսունակ են մնում էուպլոիդ բջիջները:

Changes in cytological parameters of MT-4 continuous lymphoblastoid cell line at cultivation

L.O. Abroyan, L.H. Hakobyan, A. S. Avetisyan, E.M. Karalova

It has been shown that at cultivation of MT-4 continuous lymphoblastoid cell line decreases proliferative activity and an average number of nucleoli in a nucleus is decreased, and at the end of cultivation there appear notnucleolar cells and the percent of dead cells increases. Average DNA content in nuclei on the first day changes nearly three fold, then gradually decreases, by the fourth day decreases up to nearly diploid amounts. The percentage of euploid cells by the fourth day reaches 75% of population, and together with reduction of DNA index, the amount and the average nucleoli number this fact demonstrates that at cultivation, basically, euploid cells survive.

Լիտերատուրա

1. Ե.Մ. Կարալովա, Լ.Ա. Կամալյան, Լ.Օ. Աբրոյան և ծր. Поведение клеток перевиваемой культуры НЕР-2 и их ядерно-ядрышкового аппарата в процессе культивирования и под действием На-дс-РНК. Цитология, 2003, т.45, 8, с.764-769.
2. Կարալովա Ե.Մ., Աբրոյան Լ.Օ., Այոպյան Լ.Օ., Կարաջեյան Կ.Գ., Մագակյան Ե.Ս. Поведение ядер и ядрышкообразующих районов хромосом лимфоцитов на разных стадиях развития периодической болезни. Цитология, 2004, т. 46, 4, с. 376- 380.
3. Կարալովա Ե.Մ., Աբրոյան Լ.Օ., Այոպյան Լ.Օ. և ծր. Цитологический анализ действия

индукторов интерферона различного происхождения и лейкоцитарного интерферона на трансформированную линию рака гортани человека в процессе культивирования. Мед. наука Армении НАН РА, 2007, т. XLVII, 4, с. 57-64.

4. Кунафина Э.Р., Чаплина М.В., Филясова Е.Н., Габанова Н.В., Ходарович Ю.М., Ларионова О.А., Зацепина О.В. Активация ядрышковых организаторов при культивировании мышинных эмбриональных стволовых клеток линии RI *in vitro*. Онтогенез, 2005, т.36, 2, с. 102-109.
5. Куц А.А., Шумай Е.П., Глухова Л.А., Аветисян А.С., Каралова Е.М., Грабовская А.Л., Капанцян А.Л., Магакян Ю.А. Иммуноцитометрический и цитогенетический анализ клеток Т-лимфобластоидных линий при экспериментальной ВИЧ инфекции. Вопросы вирусологии, 1994, т.39, 2, с. 77-80.
6. Магакян Ю.А., Каралова Е.М. Цитометрия ДНК. Ереван, 1989.
7. Магакян Ю.А., Каралова Е.М., Аброян Л.О., Акопян Л.А. Сравнительный многопараметрический анализ поведения лимфоцитов, их ядер и ядрышек при периодической болезни и лейкозе. Бюл. exper. биол. и мед., 2008, т. 145, 2, с. 162-167.
8. Турилова В.И., Смирнова Т.Д., Самойлович М.П., Сухих Т.Р. Функциональная морфология ядрышкообразующих районов хромосом и ядрышек в клетках линий множественной миеломы человека. Цитология, 1998, т.40, 6, с.536-548.
9. Штейн Г.И., Кудрявцева М.В., Кудрявцев Б.Н. Изменение морфометрических параметров окрашенных серебром ядрышек гепатоцитов крыс при циррозе печени и в процессе ее реабилитации. Цитология, 1999, т.41 7, с. 574 – 579.
10. De Angelis P.M., Stokke T., Clausen O.P. NO38 expression and nucleolar counts are correlated with cellular DNA content but not with proliferation parameters in colorectal carcinoma, Mol. Pathol., 1997, 50, 4, p. 201-208.
11. Derenzini M., Trere D., Pession A., Govoni M., Sirri V., Chieco P. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues, J. Pathology, 2000; 19 2, p. 181-186.
12. Karalyan Z. A., Djagatspanyan N. G., Gasparyan M. H., Abroyan L. O., Hakobyan L.H. et al. New indices in morphometry of nuclear structure of NIH 3T3 cell line, Cell Biol. Int., 2003, 127, 10, p.809- 814
13. A.A. Kushch, L.A. Glukhova and G.G.Miller Cytogenetic analysis of continuous cell lines sensitive to and infected by hiv-1, Sov. Sci.Rev. E. Virology, 1995, 5, p.83-112.
14. Mamaev N.N., Mamaeva S.E. Nucleolar organizer region activity in human chromosome and interphase nuclei of normal, leukemic, and tumor cells as evaluated by silver staining, Int. Rev. Cytol., 1990, 121 : 233 - 266.
15. Morais M., Docckery P., White Fh., A quantitative study of silver- stained NORs in different segments of the normal human colorectal crypt, J. Anat., 1996, 188 (Pt 3): 521-527.
16. Ueki T., Nakaayama Y., Sugao Y., Kohno K., Matsuo., et al. Significance of the expression of proliferation-associated nucleolar antigen p120 in human colorectal tumors, Hum. Pathol., 1997, 28, 1, p.74-79.
17. Papadopoulos N., Kotini A., Lambropoulou M., Tamiolakis D. Nucleolar organizer regions: their significance in protein synthesis and consequent release of factors that attract immature lymphocytes in different types of thymic epitheliocytes and in different stages of thymic development, Clin. Exp. Obstet. Gynecol., 2002, 29, 1, p. 57-61.