

УДК 576.8.095.874:593.1

ЦИТОЛОГИЯ

Н. Н. СУХАРЕВА-НЕМАКОВА, В. Ф. КОРНИЛОВА, Н. Ш. ЛОСАБЕРИДЗЕ

**ВЛИЯНИЕ ТРИПАФЛАВИНА НА РАЗМНОЖЕНИЕ
И СУБМИКРОСКОПИЧЕСКУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ
Crithidia oncopelti (ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
В УСЛОВИЯХ АКТИВНОЙ АЭРАЦИИ)**

(Представлено академиком А. И. Опариным 17 XII 1970)

Интерес к представителям семейства *Trypanosomidae* связан с наличием в клетках этих организмов наряду с ядром другого самовоспроизводящегося богатого нуклеиновыми кислотами органоида — кинетопласта, происхождение и функциональная роль которого обсуждаются в литературе.

Установлено, что малые концентрации производных акридина (акрифлавин, триафлавин) при определенных условиях культивирования в достаточной мере избирательно ингибируют синтез ДНК кинетопласта с образованием свыше 70% дискинетопластных форм (¹⁻⁶). Ингибирование синтеза кинетопластной ДНК коррелирует со снижением дыхательной активности, скорости роста и конечного накопления клеток (⁷). В митохондриях, выделенных из этих клеток, наблюдалось резкое снижение концентрации цитохромов, НАД-Н, сукцин- и *L*- α -глицерофосфатоксидаз, сукцин и *L*- α -глицерофосфатдегидрогеназ.

Люминесцентно-микроскопическим методом исследовано распределение триафлавиона, добавленного в среду в концентрациях 1000—0,025 $\mu\text{г/мл}$, между кинетопластом, ядром и цитоплазмой клеток *Crithidia oncopelti*, выращенных в условиях пассивной аэрации. Максимальное содержание дискинетопластных форм (70%) получено при концентрации триафлавиона в среде, равной 1,85 $\mu\text{г/мл}$. Наряду с этим установлено увеличение содержания безъядерных клеток до 20,5% при повышении содержания красителя в среде от 1,85 до 1000 $\mu\text{г/мл}$, что подтверждает полученные ранее данные (⁸). Применение высоких доз триафлавиона (1000—3,9 $\mu\text{г/мл}$) дало возможность установить образование трех морфологически измененных типов клеток: 75—25% карликовых форм, 4—3% гигантских многоядерных форм, 15—40% раздутых округлившихся клеток, лишенных либо ядра, либо кинетопласта.

В дальнейшем были изучены закономерности размножения клеток *Crithidia oncopelti* и особенности их субмикроскопической организации в присутствии высоких концентраций триафлавиона (600 $\mu\text{г/мл}$ и 3,9 $\mu\text{г/мл}$) в условиях активной аэрации (1 объем воздуха на 1 л среды в минуту). Для поддержания штамма и проведения экспериментов использовали пептонную среду описанного ранее состава (⁹). Распределение триафлавиона изучали с помощью люминесцентного микроскопа МЛ-2 (об. 90 $\times$, ок. 10 $\times$) на препаратах клеток, отмытых физиологическим раствором и зафиксированных смесью ледяной уксусной кислоты и абсолютного этилового спирта в соотношении 1:3. Ядра, кинетопласты и биполярные тельца изучали на этих препаратах путем окрашивания их ДНК люминесцентным реактивом Шиффа (¹⁰). Для электронномикроскопического анализа отмытые клетки фиксировали 0,1% глутаральдегидом в растворе Хэнкса (30—40 мин.) с последующей фиксацией в 2% OSO_4 (1 час). Материал

обезвоживали последовательным перенесением в 70—90—100° спирт, после чего заливали в смесь бутил- и метилметакрилата (4:1). Срезы готовили на ультратоме LKB 4804A. Контрастирование проводили ацетатом уранила и исследовали в электронном микроскопе JEM-6 при 80 кв и увеличении 10 000—30 000 раз.

При люминесцентномикроскопическом изучении клеток *C. oncopelti*, накопивших триафлавин в течение 72, 168 и 312 час. культивирования, наблюдали однородное зеленоватое свечение цитоплазмы, на фоне которой не выделялось свечение ни кинетопласта, ни ядра (рис. 1А, а). Докраска клеток на ДНК люминесцентным реактивом Шиффа дала возможность выявить ядра и кинетопласты (рис. 1А, б). Отсутствие более интенсивного накопления триафлавина в кинетопластах и ядрах без образования дискинетопластных и безъядерных форм отличает эти культуры от культур, выращенных на той же среде в условиях пассивной аэрации. 60% клеток сохраняли типичную лептомонадную форму. Наряду с этим встречались слегка раздутые и округлившиеся клетки (20%), а также карликовые формы (рис. 1А, в).

Число карликовых форм в условиях активной аэрации не превышает 15—20% через 72 часа культивирования, а затем снижается до 11,8—7,8% к 312—360 час. инкубации с триафлавином в концентрациях 600 и 3,9 мкг/мл соответственно. В культуре изредка встречаются многоядерные клетки в количестве 1—2% (рис. 1А, г).

В процессе подготовки к делению клетка расширяется, а ядро передвигается к ее середине. Поэтому в популяции клеток расстояния между ядром и кинетопластом могут быть различные в зависимости от подготовленности клетки к делению. Ядро увеличивается в диаметре, становится менее компактным, хроматиновый материал отодвигается к периферической области, образуя кольцо, а в центре — область, слабо окрашивающуюся на ДНК (рис. 1А, д). Это кольцо либо гомогенно по всей окружности ядра, либо ДНК концентрируется на одном или двух полюсах его. По-видимому, такие крупные угловатые ядра соответствуют профазе. Постепенно нежные хроматиновые нити утолщаются, образуя небольшие число коротких интенсивно окрашенных на ДНК телец или сегментов. Этот период деления, вероятно, соответствует метафазе. Позднее ядро приобретает продолговатую форму, и тельца располагаются перпендикулярно длинной оси ядра (анафаза). Телофаза характеризуется восстановлением ядра. Подобную картину наблюдал Диаз при изучении деления ядер *Trypanosoma cruzi* (11).

При делении кинетопласта можно наблюдать сходный процесс: образование фельген-положительного периферического кольца (рис. 1А, е), затем хроматиновый материал концентрируется на одном из полюсов в форме подковы (рис. 1А, е), которая выпрямляется и образует палочку, делящуюся поперечно. В задней части клетки лежат бактериоподобные структуры — биполярные тельца, которые делятся синхронно с делением ядра и кинетопласта. После окончания деления ядра, кинетопласта и биполярного тельца начинается деление жгута и цитоплазмы, прогрессирующее от переднего конца к заднему.

Электронномикроскопическое наблюдение клеток *C. oncopelti* в норме выявляет общую специфику строения, описанную для большинства трипанозомид (12, 13). Клетка *C. oncopelti* окружена перипластом, состоящим из двух электронно-плотных слоев толщиной по 20 Å каждый, между которыми расположен светлый слой толщиной 60 Å. Клеточная мембрана переходит в жгут, имеющий типичное строение (9 периферических и 2 центральных фибриллы). Непосредственно под перипластом лежат полые микротрубочки диаметром 220 Å, расстояние между которыми 550 Å (рис. 1Б, а). Митохондрии прилегают к внутренней цитоплазматической мембране. Они имеют форму шаровидных, овальных или палочковидных телец, окруженных мембраной, состоящей из двух электронно-плотных

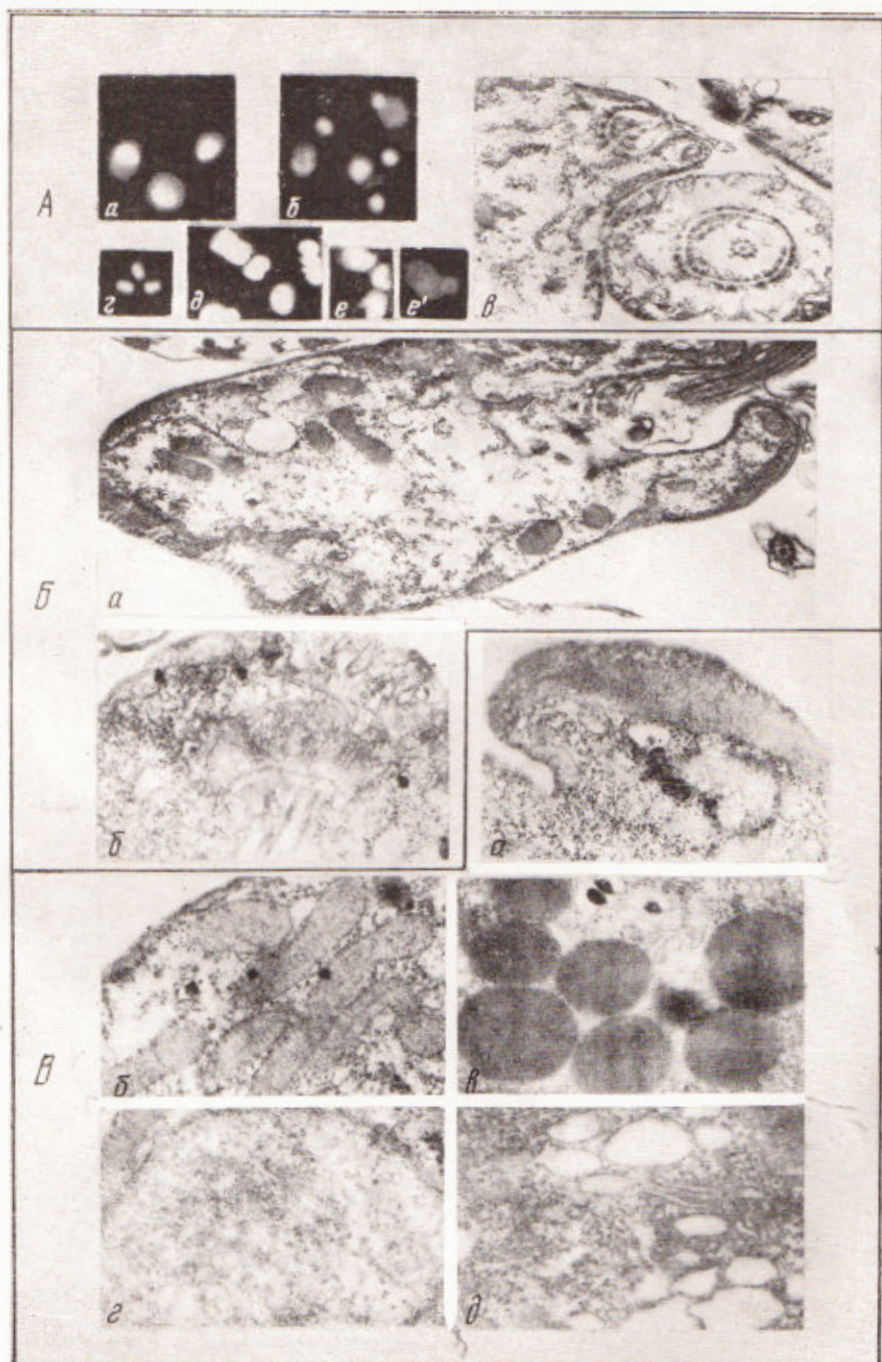


Рис. 1. А: а — клетки *S. oncoscelti*, равномерно окрашенные триафлавином, б — кинетошасты и ядра этих клеток, в — карликовые и раздутые клетки, г — многоядерные клетки, д — процесс деления ядра, е — процесс деления кинетошасты, образование подковки и палочки; Б: а — клетка *S. oncoscelti* в норме, б — бифаропластно-кинетошастный комплекс; В: а — образование карликовых форм, б — усиленный рост биполярных телец, в — липиды в клетках к 72 час. культивирования, г — увеличение ядра в клетке к 168 час культивирования, д — вакуолизация цитоплазмы (к тому же сроку), микроскоп люминесцентный, 25 000—30 000×

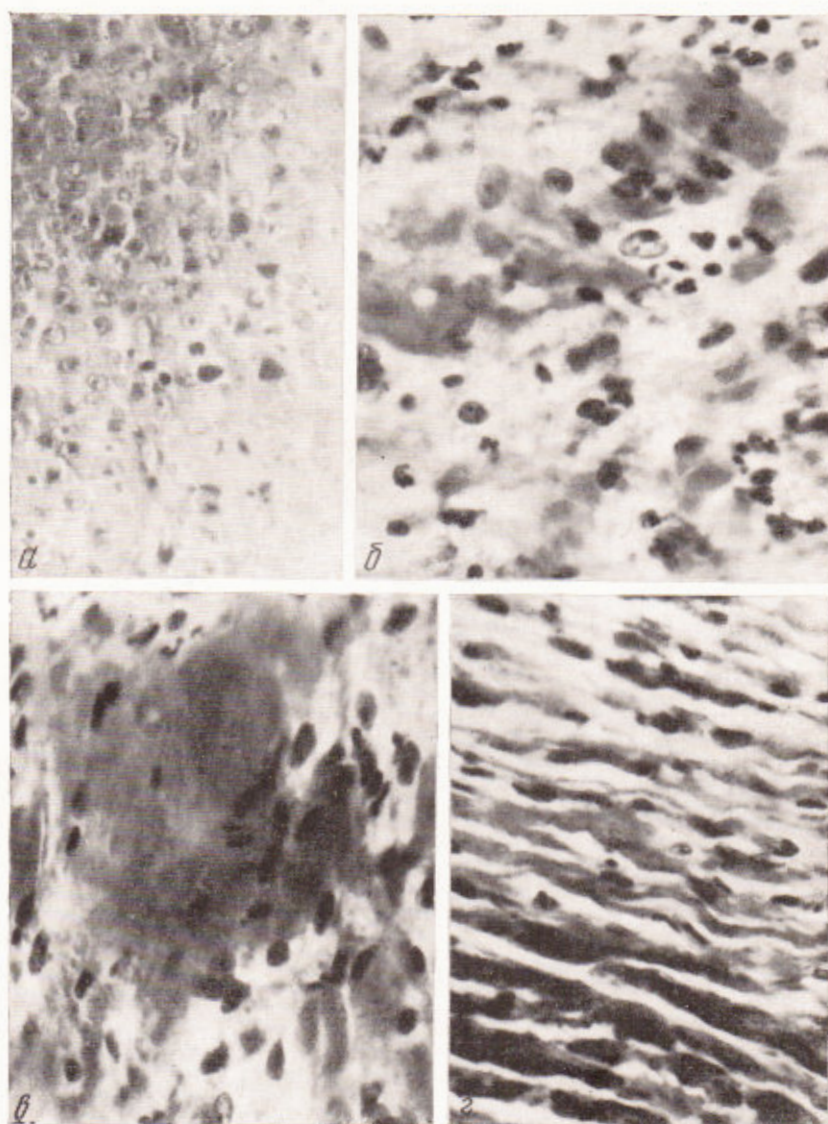


Рис. 1. Карцинома Уокера. Окраска пикрофуксином. 144х. Контрольная серия (а). После применения МГГ-2: б — видны лимфоциты, фибробласты и глыбы коллагена; в — видны большие глыбы коллагена; г — мощная соединительно-тканная капсула, окружающая пикнотически измененные опухолевые клетки

слоев по 20 Å каждый, и расположенного между ними электронно-проницаемого слоя толщиной 80 Å. Внутренняя мембрана митохондрий образует большее или меньшее число крист. Ядро, расположенное ближе к переднему концу клетки и имеющее средний диаметр 1—1,5 μ , окружено двойной мембраной. Впереди ядра лежит кинетопласт, окруженный оболочкой из двух темных слоев и лежащим между ними светлым слоем (рис. 1Б, б). Размеры его составляют 9000 и 6000 Å в диаметре. Область между кинетопластом и основанием жгута занимает блефаропластно-кинетопластный комплекс (рис. 1Б, б). Рядом с ним находится аппарат Гольджи, представляющий собой систему внутриклеточных мембран, тесно связанных с прозрачными вакуолями. В задней части клетки находятся биполярные тельца.

Цитоплазма простейшего богата рибосомами, которые соединяются в полирибосомные структуры.

Электронномикроскопическое изучение клеток *C. oncopelti*, выращенных в присутствии 600 μ г/мл триафлавина, дает возможность выявить следующие отклонения от нормы через 72 часа после посева: 1) Нарушение механизма нормального бинарного деления, выражающееся в появлении на материнской клетке маленькой почки, имеющей структуры, свойственные взрослой клетке (рис. 1В, а). Эта клетка постепенно отделяется от материнской. По-видимому, таким способом образуются наблюдаемые в светооптическом микроскопе карликовые формы. 2) Многоядерные клетки, образование которых связано, по-видимому, с задержкой цитокинеза. 3) Усиленный рост биполярных телец (рис. 1В, б). 4) Слияние отдельных митохондрий в длинные рукава, лежащие под внутренней цитоплазматической мембраной и примыкающие к кинетопласту. 5) Раздвоение заднего конца клетки. Аналогичное явление наблюдалось при добавлении пенициллина. 6) Уменьшение содержания рибосом и полирибосом в цитоплазме. 7) Накопление крупных капель липидов в цитоплазме (рис. 1В, в).

При электронномикроскопическом исследовании культур через 168 час. инкубации с 600 μ г/мл триафлавина было обнаружено увеличение ядер, утрата большинства митохондрий, сильная вакуолизация цитоплазмы, уменьшение или полное исчезновение капель липидов (рис. 1В, г, д). К 312 часам культивирования с триафлавином для большинства клеток характерно нормальное бинарное деление, исчезновение почек и уменьшение числа карликовых форм, богатый рибосомами, полисомами и не содержащий липидных капель цитоплазматический ретикулум.

При посеве культуры *C. oncopelti* в среду с триафлавином наблюдается продолжительный период отсутствия деления, составляющий 168—144 часа соответственно снижению концентрации красителя от 600 до 3,9 μ г/мл. Несмотря на отсутствие размножения клеток в этот период, культура характеризуется высоким уровнем расщепления глюкозы, сопровождающимся снижением значения pH от 7,8—7,6 до 5,3—5,8 соответственно концентрации красителя в среде. Установлено, что при ингибировании дыхания культура *C. oncopelti* переходит от аэробного окисления глюкозы к анаэробному расщеплению с преимущественным образованием янтарной и пировиноградной кислот⁽¹⁴⁾. Этот процесс является важным источником энергии, обеспечивающим конструктивные процессы и подвижность клеток. Число клеток в среде, содержащей 600 μ г/мл триафлавина, удваивается к 312 час. культивирования. Время генерации составляет 144 часа.

При выращивании *C. oncopelti* в среде, содержащей 3,9 μ г/мл триафлавина, длительность лаг-фазы сокращается до 144 час. Затем культура переходит в фазу, характеризующуюся постепенным увеличением скорости размножения в 10 раз. Удвоение числа клеток в культуре (52,5 млн./мл) наблюдается к 216 час. инкубации, а время генерации в этот период составляет 62 часа. К 264 час. культивирования число клеток увеличивается в 4 раза (до 200 млн./мл), а время генерации сокращается до 12 час.,

что соответствует времени генерации контрольных культур, выращенных при тех же условиях, но без добавления трипафлавина. Максимальное накопление клеток, равное 320 млн/мл, было получено к 360 час. инкубации (предельный срок культивирования).

Значение pH культуральной жидкости, достигнув минимума к 246 час. (4,64), смещается в щелочную зону (до 7,8). Это свидетельствует о наличии типичного для контрольных культур *C. oncopelti* процесса дезаминирования аминокислот и использования их углеродных цепочек в качестве источника углерода и энергии при отсутствии глюкозы в среде (⁹). Липиды, исчезающие из цитоплазмы, по-видимому, являются для клетки не менее важным источником углерода и энергии, обеспечивающим высокую скорость их размножения и значительное накопление в культуре.

Таким образом, активное аэрирование среды создает условия, достаточно благоприятные для развития культуры и накопления липидов при высоких концентрациях трипафлавина. При этом не происходит образования дискинетопластных или безъядерных форм. Накопление липидов в клетках, по-видимому, связано с ингибированием красителем окислительных ферментов (⁷) и нарушением углеводного обмена.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Г. Ф. Гамалея
Москва

Поступило
7 XII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Mühlfordt, Zs. Tropenmed. u. Parasitol., 10, 19 (1959). ² H. Mühlfordt, Zs. Tropenmed. u. Parasitol., 14, 357 (1963). ³ W. Trager, M. A. Rudzinska, J. Protozool., 11, 133 (1964). ⁴ H. N. Guttman, R. N. Eisenman, Nature, 207, 1280 (1965). ⁵ M. Steinert, S. van Assel, J. Cell Biol., 34, 489 (1967). ⁶ L. Simpson, J. Cell Biol., 87, 660 (1968). ⁷ G. C. Hill, W. A. Anderson, J. Cell Biol., 41, 547 (1969). ⁸ Н. Н. Сухарева-Немакова, Е. Н. Хачатуров, Цитология, 11, 1105 (1969). ⁹ Н. Н. Сухарева-Немакова, Р. Н. Зеленева и др., Вести. Московск. ун-в., № 3, 9 (1969). ¹⁰ Е. Н. Хачатуров, Е. А. Смирнова, Изв. АН СССР, сер. биол., 6, 900 (1966). ¹¹ A. M. Diaz, Biologia (Chile), 21, 90 (1955). ¹² B. A. Newton, R. W. Horne, Exp. Cell Res., 13, 563 (1957). ¹³ T. B. Clark, F. G. Wallace, J. Protozool., 7, 115 (1960). ¹⁴ I. E. Ryley, Biochem. J., 59, 353 (1955).