Доклады Академии наук СССР
1972. Том 206, № 6

УДК 576.312.3:599.82

ГЕНЕТИКА

З. А. ДЖЕМИЛЕВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОМЕНА АССОЦИАЦИЙ МАРКЕРНЫХ ХРОМОСОМ У ОБЕЗЬЯН.

ОБНАРУЖЕНИЕ IN VITRO МАЛЫХ ЛИМФОЦИТОВ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ СТРУКТУРНО И ФУНКЦИОНАЛЬНО

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 27 I 1972)

Ранее нами в культуре лимфоцитов периферической крови обезьян Macaca mulatta был обнаружен феномен ассоциации маркерных хромосом [1]. Исследование этого феномена при облучении лимфоцитов в дозе 100 р вне клеточного цикла (G_0) и на разных стадиях митотического цикла (G_1‖ S, G_2) показало, что по мере прохождения клеткой отдельных фаз цикла частота ассоциирующих гомологичных маркерных хромосом уменьшается, достигая контрольного уровня в клетках, облученных в стадии G_2 [2]. Максимальное число клеток с ассоциацией маркерных хромосом было обнаружено при облучении клеток в G_0, причем оно не превышало 50%. В связи с этим возник вопрос, можно ли при повышении дозы облучения добиться увеличения частоты ассоциаций до 100%, т. е. все ли малые лимфоциты периферической крови, претерпевшие бласттрансформацию, способны формировать ассоциации маркеров.

С целью выяснения этого вопроса было проведено исследование частоты клеток с ассоциацией ядрышкообразующих хромосом в культуре лимфоцитов обезьян Macaca mulatta (3 самца в возрасте 9—12 лет), облученных в G_0 на аппарате РУМ-3 в дозах 25, 50, 100, 200 и 400 р.

Из данных табл. 1 видно, что при облучении культур в дозах 25, 50 р частота клеток с ассоциацией увеличивается с повышением дозы. Дальнейшее же повышение дозы (100, 200 и 400 р) не приводит к изменению частоты клеток с ассоциирующими маркерами. Наличие пороговой дозы, близкой к 50 р, позволило высказать предположение о том, что среди малых лимфоцитов периферической крови обезьян имеется по крайней мере два типа клеток.

I. Лимфоциты, в которых оба гомологичных маркера контактируют. Контакт между ядрышкообразующими зонами, по-видимому, обусловливает совместное их участие в формировании общего для них ядрышка.

Таблица 1

Частота клеток с ассоциацией маркерных хромосом в культуре лимфоцитов периферической крови обезьян Macaca mulatta при разных дозах облучения (фиксация в первом митозе на 50 часу роста)

Доза, р	Проанализировано метафаз	Число клеток с ассоциацией маркерных хромосом		Доза, р	Проанализировано метафаз	Число клеток с ассоциацией маркерных хромосом	
		абс.	%			абс.	%
0	564	43	7,6±1,1	100	1401	590	42,1±1,3
25	602	118	19,6±1,6	200	671	298	44,4±1,9
50	895	355	40,1±1,7	400	250	102	40,8±3,1

Этот тип лимфоцитов в большинстве случаев должен иметь одно единственное ядрышко.

II. Лимфоциты, в которых гомологичные маркерные хромосомы не контактируют. При отсутствии контакта, по-видимому, каждый гомолог формирует свое самостоятельное ядрышко. Такие лимфоциты в процессе бласттрансформации должны образовать два ядрышка.

С целью проверки высказанной гипотезы мы провели исследование ядрышек в бластоидных клетках. Нам удалось обнаружить только два типа морфологически различающихся бластоидных клеток: одно- и двуядрышковые. Следовательно, предположение о том, что в периферической крови обезьян имеется два типа малых лимфоцитов, получило цитологическое подтверждение. Поскольку маркерные хромосомы участвуют в формировании ядрышек, мы попытались установить взаимосвязь между частотой ассоциаций и частотой бластоидных клеток, имеющих одно ядрышко, при облучении лимфоцитов в G_0 рентгеновскими лучами в дозе 100 р и фиксации культур на 50 и 72 часу роста. Результаты этого анализа приведены на рис. 1.

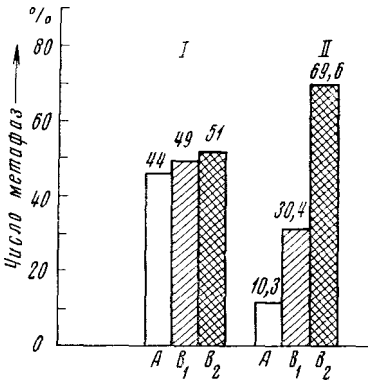

Рис. 1. Распределение метафаз с ассоциацией маркерных хромосом (A), одноядрышковых (B_1) и двуядрышковых (B_2) бластоидных клеток при облучении культур в дозе 100 р и фиксации на 50 (I) и 72 (II) часах роста

Из рисунка видно, что при увеличении продолжительности культивирования лимфоцитов, облученных в дозе 100 р, частота ассоциаций маркерных хромосом уменьшается. Наряду с этим падает число одноядрышковых бластоидных клеток. Эти данные показывают, что частота одноядрышковых клеток и частота клеток с ассоциацией маркеров связаны прямой зависимостью: чем больше одноядрышковых бластов, тем выше число метафаз с ассоциацией маркеров. Следовательно, малые лимфоциты с ассоциирующими маркерами в процессе бласттрансформации формируют одно ядрышко; лимфоциты, в которых ядрышкообразующие зоны маркеров пространственно разобщены, т. е. не ассоциируют, формируют два ядрышка. Некоторое несовпадение числа клеток с ассоциацией гомологов с числом одноядрышковых бластов при фиксации культур на 50 часу роста, возможно, связано с тем, что генерационный цикл у двуядрышковых бластов короче, чем у одноядрышковых. При фиксации клеток на 72 часу роста эти различия более выражены. Культуры, фиксированные на 72 часу роста, представляют смесь первого и второго клеточного поколения. Митотический цикл клеток второго поколения, согласно нашим данным, менее продолжителен, чем первого ([3]). Этим можно объяснить наблюдаемые расхождения.

Увеличение числа двуядрышковых бластов при более длительном культивировании (рис. 1) свидетельствует о том, что лимфоциты, формирующие в бластогенезе два ядрышка,— это молодые, а формирующие одно ядрышко — зрелые интерфазные клетки. По-видимому, это — две стадии созревания малого лимфоцита. Молодой лимфоцит после стабилизации ассоциаций маркеров становится зрелым. В связи с этим логично было предположить, что лимфоциты, формирующие в бластогенезе одно ядрышко, являются функционально зрелыми, т. е. иммунологически зрелыми клетками. Для выяснения этого вопроса мы провели исследование частоты ассоциаций и анализ ядрышек в культурах лимфоцитов крови, полученных от трех половозрелых самок макак резусов (возраст 14—17 лет) до и после введения в организм иммунодепрессора — антилимфоцитарного иммуноглобулина (АЛГ). Известно, что АЛГ против лимфо-

цитов человека оказывает иммунодепрессивное действие на обезьянах ([4], [5]). С целью выявления максимального числа клеток с ассоциацией маркеров часть культур сразу после посева облучали рентгеновскими лучами в дозе 100 р. АЛГ против лимфоцитов человека, выпускаемый лабораторией Choay (Париж), вводили обезьянам в течение трех дней: в первый день по 2,5 мл, в последующие — по 5 мл каждой обезьяне. Общая доза введенного АЛГ составляла 1 мл на 1 кг веса. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Из материалов таблицы видно, что до введения АЛГ число метафаз с ассоциацией маркеров в облученных культурах значительно выше, чем в контрольных, в то время как соотношение одно- и двуядрышковых бластоидных клеток не изменяется. В облученных и контрольных культурах,

Таблица 2

Частота ассоциаций и число одно- и двуядрышковых бластоидных клеток в норме и при облучении культур, посеянных до и после окончания курса введения обезьянам АЛГ (облучение в G_0 в дозе 100 р, фиксация на 50 часу роста)

Время взятия материала	Культуры	Исследовано метафаз	Число метафаз с ассоциацией маркеров		Исследовано бластоидных клеток	Одноядрышковые		Двуядрышковые	
			абс.	%		абс.	%	абс.	%
До введения АЛГ	Контрольные	320	16	5,0±1,2	202	82	40,6±3,5	120	59,4±3,5
	Облученные 100 р	347	127	36,6±2,6	334	130	39,0±2,7	204	61,0±2,7
После окончания курса введения АЛГ	Контрольные	220	0	0	203	4	2,0±0,3	199	98,0±0,3
	Облученные 100 р	210	2	1,0±0,2	490	8	1,6±0,2	482	98,4±0,2

посеянных на следующий день после окончания курса введения АЛГ, резко снижается как число метафаз с ассоциацией маркеров, так и число одноядрышковых бластоидных клеток.

Эти данные, во-первых, свидетельствуют о том, что малые лимфоциты с ассоциирующими маркерами формируют одно ядрышко, во-вторых, о том, что иммунодепрессивный эффект АЛГ связан с исчезновением в популяции лимфоцитов одноядрышковых бластоидных клеток. Это является, возможно, доказательством того, что малые лимфоциты, формирующие одно ядрышко, являются зрелыми иммунологически компетентными клетками и, по-видимому, ответственны за развитие трансплантационного иммунитета. Поскольку малые лимфоциты с ассоциирующими маркерами способны формировать одно ядрышко, частота метафаз с ассоциацией маркеров и количество одноядрышковых бластоидных клеток могут, по всей вероятности, служить цитогенетическим и цитологическим тестами в иммунологии.

Практически полное отсутствие зрелых (одноядрышковых) бластоидных клеток после окончания курса введения АЛГ обезьянам можно объяснить следующими предположениями: 1) АЛГ действует избирательно на зрелые лимфоциты, лишая их способности к бласттрансформации или вызывая их элиминацию; 2) АЛГ действует на всю популяцию лимфоцитов, вызывая в одинаковой степени элиминацию зрелых и молодых клеток. В этом случае бластогенезу могут подвергаться молодые лимфоциты, вновь поступившие в кровь.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в культуре лимфоцитов периферической крови обезьян имеются два типа морфологически различающихся бластоидных клеток, которые, по-види-

мому, являются двумя стадиями созревания малого лимфоцита. Не исключено, что зрелые лимфоциты, формирующие одно ядрышко, ответственны за трансплантационный иммунитет. В настоящее время этот вопрос проверяется нами экспериментально.

Институт экспериментальной патологии и терапии
Академии медицинских наук СССР
Сухуми

Поступило
27 I 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] З. А. Джемилев, Сравнительное изучение радиочувствительности хромосом лейкоцитов периферической крови человека и обезьяны Macaca mulatta в разных фазах митотического цикла. Кандидатская диссертация, Сухуми, 1968. [2] З. А. Джемилев, Цитология, **12**, № 4, 534 (1970). [3] З. А. Джемилев, Ю. А. Митрофанов, Бюлл. эксп. биол. и мед., **1**, 74 (1969). [4] H. Balner et al., In: Organtransplantation, Immunologie und Klinik. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Allergie- und Immunitätsforschung, Stuttgart — N. Y., 1968, p. 207. [5] H. Balner, Federat. Proc., **29**, № 1, 117 (1970).