

TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI

TOIMETISED

УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ
ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS

499

RAKKUDE DIFERENTSEERUMINE
in vivo JA *in vitro*

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК
in vivo И *in vitro*

TSÜTOLOOGIA- JA GENEETIKA-
ALASED TÖÖD

II

ТРУДЫ ПО ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКЕ

TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI TOIMETISED
УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ
ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS
ALUSTATUD 1893.a. VIHK 499 ВЫПУСК ОСНОВАНЫ В 1893.g.

RAKKUDE DIFERENTSEERUMINE
in vivo JA *in vitro*

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК
in vivo И *in vitro*

TSÜTOLOOGIA- JA GENEETIKA-
ALASED TÖÖD

II

ТРУДЫ ПО ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКЕ

TARTU 1979

Ученые записки Тартуского государственного университета.
Выпуск 499. ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК *in vivo* И *in vitro*.
Труды по цитологии и генетике II. На русском языке. Ре-
зюме на английском языке. Тартуский государственный уни-
верситет. ЭССР, г. Тарту, ул. Лийкооли, 18. Ответствен-
ный редактор Л. Касака. Корректоры В. Логинова, Х. Лийв. Сда-
но в печать 19.03.79. Бумага печатная 30x45 1/4. Печат-
ных листов 9,0+15 вклеек. Учетно-издат. листов 8,0. Ти-
раж 500. МВ 01041. Типография ТТУ, ЭССР, г. Тарту, ул.
Пялсона, 14. Зак. № 911. Цена I руб. 20 коп.

2 - 8

СОДЕРЖАНИЕ

М.Х. В и й к м а а, Ю.К. К я р н е р. Особенности дифференцировки и функционирования вспомогательных клеток яичевого фолликула дрозофилы.....	5
M. V i i k m a a, J. K ä r n e r. On the differentiation and function of trophocytes and follicle cells in Drosophila egg chamber. Summary.	17
Х.И. К а л л а к, М.А. В а п п е р. Цитогенетическая характеристика длительно культивированного каллуса креписа.....	18
H. K a l l a k, M. V a r r e r. Cytogenetic characteristic of long-term callus culture of Crepis capillaris. Summary.	29
Х.И. К а л л а к, Л.Я. Я р в е к ю л ь г, М.А. В а п п е р. Культура растительных тканей как модель для изучения мутагенного действия гербицидов.....	30
H. K a l l a k, L. J ä r v e k ü l g, M. V a r r e r. Plant tissue culture as a model for mutagenicity testing of herbicides. Summary.	47
A.O. П и й р с о о. Гистохимический анализ эмбриональной селезенки в тканевой культуре.....	48
A. P i i r s o o. Histochemical identification of cells in tissue cultures of embryonic spleen. Summary.	58
A.O. П и й р с о о. Клеточный состав селезенки эмбрионов и новорожденных животных.....	59
A. P i i r s o o. The spleen cellular content of embryos and newborns. Summary.	77
Э.Т. Т а л л м е й с т е р, О.П. Л а й д у с, А.Л. Х е й н а р у. Изменение биологических свойств штаммов энтеробактерий под влиянием трансмиссив-	

НХ R- и Col-ПЛАЗМИД.....	78
Е. Т а л л м е и с т е р, О. Л а и д у с, А. Н е и н а г у. Changes in biological characters of the strains of enterobacteria by transmissible R- and Col-plasmids. Summary.	89
А.Л. Х е й н а р у. О возможной роли экстрахромосомных элементов в адаптации и в эволюции.	90
А. Н е и н а г у. On a possible role of extrachromosomal elements in adaptation and evolution. Summary.	105
А.Л. Х е й н а р у, Р. К и р х, Э.Т. Т а л л м е й с т е р. О R-, Col- и Hly-плазмидах у штаммов бактерий, изолированных от поросят.....	106
А. Н е и н а г у, Р. К и р с c h, Е. Т а л л м е и с т е р. On R-, Col- and Hly-plasmids in the strains of bacteria isolated from piglets. Summary.	127
А.Л. Х е й н а р у, Р.Х. М е т с и к. Возникновение колицинорезистентности у Escherichia coli как удобная модель для изучения мутагенного действия химикатов.....	128
А. Н е и н а г у, Р. М е т с и к. Induction of resistance to colicins in Escherichia coli as a suitable model for mutagenicity screening. Summary.	132

ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ЯЙЦЕВОГО ФOLЛИКУЛА ДРОЗОФИЛЫ

М.Х. Вийкмаа, Ю.К. Кярнер

Оогенез у мух происходит по меристическому политрофному типу. Ооцит развивается в фолликуле, включающем два типа вспомогательных клеток: питающих и фолликулярных. Оогенез у дрозофилы делится на 14 стадий, семь из них представляют стадии развития фолликула до образования желтка, а семь последних — стадии вителлогенеза и образования яйцевых оболочек /1/. В ходе большей части этого развития вспомогательные клетки полиплоидизируются и растут, а затем быстро дегенерируют. Ооцит начинает быстрый рост с 7-ой стадии; за весь период развития яйцевого фолликула, который длится около 78 часов, ооцит увеличивается в объеме приблизительно в 200 тысяч раз /1/. Такой быстрый рост свидетельствует, с какой поразительной скоростью должны протекать процессы синтеза, накопления и структурообразования.

Особенностью меристического оогенеза является то, что ядро растущего ооцита в инактивном состоянии не синтезирует РНК /2, 3/. Поэтому вспомогательные клетки должны обеспечивать ооцит всеми компонентами, нужными для образования желтка и цитоплазматических структур. Следовательно, изучение структурной и функциональной динамики этих клеток является необходимым условием для выяснения закономерностей оогенеза такого типа и механизмов становления морфогенетической организации цитоплазмы яйцеклетки. Яйцевой фолликул может быть также хорошим объектом изучения механизмов межклеточного переноса и взаимодействия клеток как фактора дифференцировки и координированного развития функционально целостной системы клеток.

Основные заслуги описания стадий развития и цитологических превращений яйцевого фолликула дрозофилы принадлежат Кингу (King) и его сотрудникам /1, 4-7/.

Ооцит и 15 питающих клеток (трофоцитов) происходят из одного единственного оогония. Они остаются между собой связанными цитоплазматическими мостиками (кольцевидными каналами), продуктами неплохой цитотомии /8/. Ооцит находится на

заднем конце фолликула.

Трофобласты растут до 10-ой стадии, их ядра сильно полиплоидизируются (содержание ДНК > 1000с). На 11-13-ой стадиях основная часть их цитоплазмы переносится в ооцит, а оставшаяся часть и ядра разлагаются /6/. Структура цитоплазмы трофобластов мало изучена. По имеющимся данным, она богата рибосомами и липидными каплями, митохондриями, но мало содержит мембранных структур цитоплазматической сети и комплекса Гольджи. Трофобласты обеспечивают ооцит липидами, рибонуклеопротеидами (рибосомами, инфосомами) и митохондриями. Пока не выяснено, переносятся ли при распаде трофобластов в ооцит интактные компоненты цитоплазмы (в частности митохондрии) или они подвергаются предварительному превращению и деградаци.

Фолликулярные клетки происходят из мезодермальной ткани яичника /8/. В раннем развитии фолликула они окружают равномерным слоем кубических клеток ооцит и трофобласты. На свободную поверхность фолликулярные клетки выделяют белки и полисахариды, образующие непрерывный слой (базальную мембрану) вокруг всего фолликула.

На седьмой стадии фолликулярный эпителий дифференцируется на две части: на поверхности ооцита клетки гипертрофируются и становятся цилиндрическими, а на поверхности трофобластов они уплощаются. С началом вителлогенеза связано возникновение многочисленных микроворсинок на апикальной поверхности цилиндрических фолликулярных клеток, проникающих между микроворсинками ооцита. На 9-10-ой стадиях фолликулярные клетки секретируют белки, липиды и полисахариды, образующие вителлиновую оболочку между ооцитом и фолликулярным эпителием. В последние стадии оогенеза фолликулярные клетки образуют эндо- и экзокоррион, при этом они распадаются и отчасти отторгаются.

Ультраструктура фолликулярных клеток дрозофилы изучена в основном на стадиях образования яйцевых оболочек и дегенерации трофобластов /4, 6/. Характерными структурами для фолликулярных клеток являются описанные Кингом /9/ т.н. эпителиальные тельца, представляющие собой многослойные концентрические системы гранулярных мембран, окружающих липидные капли. Утверждается, что эти образования присутствуют только в тех фолликулярных клетках, которые окружают ооцит, и только во время образования вителлиновой оболочки /4, 5/.

Кинг и сотрудники связывают функциональную роль эпителиальных тельцев с синтезом веществ для вителлиновой оболочки. Кроме этих структур в фолликулярных клетках обнаруживались множество рибосом, митохондрий, комплексы Гольджи, на последних стадиях еще каналы цитоплазматической сети и различные пузырьки, а также лизосомы (последние только в клетках, лежащих на трофоцитах /6/). Однако имеются данные, что развитая система цитоплазматической сети, комплекса Гольджи и секреторных пузырьков присутствует уже во время первых стадий вителлогенеза /10/.

Наиболее спорным вопросом в оогенезе насекомых является участие фолликулярных клеток в вителлогенезе. Кинг и сотрудники утверждают, что фолликулярные клетки в вителлогенезе не участвуют, а их функции заключаются в образовании яйцевых оболочек, и в некоторой мере в распаде трофоцитов /6/.

По распространенному положению основная масса желточных белков синтезируется жировым телом насекомого и поглощается яйцевым фолликулом из гемолимфы /11/. При этом предполагается, что гетеросинтетические белки проникают к поверхности ооцита через базальную мембрану и межклеточные пространства фолликулярного эпителия /12-14/. Показано, что отложение в ооците белков гемолимфы происходит избирательно /13/. Однако при помощи маркеров пиноцитоза обнаружено, что ооциты способны поглощать все вещества, попадающие на их поверхность, и базальная мембрана фолликула тоже не имеет избирательных свойств в отношении проницаемости различных белков и других макромолекул /15/. Следовательно, избирательность накопления желточных белков из гемолимфы должна быть обусловлена фолликулярными клетками. Но остается непонятным, каким образом эта избирательность обеспечивается, если проникновение белков через фолликулярный эпителий происходит путем диффузии по межклеточным пространствам. Кроме того, для дрозофилы и других мух не доказано, что белки вообще проходят по межклеточным пространствам /16/.

Хотя большинство исследователей считает установленным, что фолликулярные клетки не принимают прямого участия в синтезе желточных белков /11/, время от времени появляются противоположные данные. Для различных насекомых показано прямым путем, что фолликулярные клетки синтезируют и секретуют белки, которые включаются в желточные гранулы вместе с белками гемолимфы /17-19/. Более того, на основе изу-

чения вителлогенеза у мухи цеце предполагается, что фолликулярные клетки синтезируют основную часть желточных белков /16/. В пользу участия фолликулярных клеток дрозофилы в синтезе желточных белков говорит одно цитоморфологическое исследование /10/.

Для уточнения процессов и закономерностей оогенеза мы выбрали изучение развития яйцевого фолликула дрозофилы. Были поставлены следующие задачи:

1. Изучение ультраструктурной динамики вспомогательных клеток фолликула по ходу всех стадий его развития.

2. Изучение характера превращения органелл трофоцитов до поглощения их ооцитом на конечных стадиях оогенеза.

3. Выяснение роли фолликулярных клеток в вителлогенезе, в том числе в переносе белков из окружающей среды.

4. Выяснение роли фолликулярных клеток в деградации трофоцитов.

Методика

Яичники самок плодовой мушки *Drosophila melanogaster* дикой линии Canton-S в возрасте от 2 до 24 часов фиксировались глутаральдегидом и четырехокисью осмия, забуференными коллидином /20/, и заливались в Эпон 812. Срезы, полученные на ультратоме ЛКБ-8800, контрастировались уранилацетатом и цитратом свинца /21/ и просматривались в электронном микроскопе УЭМВ-100В.

Для изучения транспорта экзогенной пероксидазы, яичники инкубировались при температуре 25°C в течение 10 мин. или 1/2 часа в растворе Рингера для насекомых, содержащем 0,5%-ной пероксидазы хрена. В дальнейшем пероксидазу выявляли с помощью диаминобензидина /22/.

Для выявления кислой фосфатазы яичники фиксировались глутаральдегидом, забуференным какодилатом, инкубировались в среде Гомори, дополнительно фиксировались четырехокисью осмия и заливались в Эпон 812.

Результаты и обсуждение

Структурная динамика фолликулярных клеток

В начале изучаемого периода (стадии 4-6) фолликулярный эпителий представлен кубическими клетками по всей поверхности яйцевой камеры. Некоторые клетки соединены между собой кольцевидными канальцами, которые сохраняются и позже (рис. 1). Такие межклеточные канальцы являются характерными для трофоцитов и ооцита /1, 8/, но в фолликулярном эпителии описаны они пока только нами /23/. Присутствие их свидетельствует о необходимости таких интерцеллюлярных коммуникаций для синхронного развития и интегрированной деятельности функционально целостной клеточной популяции. Цитоплазматический матрикс изобилует свободными рибосомами, среди которых наблюдаются немногие микротрубочки. Мембранные структуры в это время очень недоразвиты. Комплекс Гольджи находится в базальной части клетки и отличается небольшой зоной (0,5-1 мкм) гомогенного матрикса с мелкими темными пузырьками. Немногочисленные митохондрии обнаруживаются преимущественно вблизи комплекса Гольджи. По краям зоны комплекса располагаются 1-2 расширенные цистерны шероховатой цитоплазматической сети, которые со стороны матрикса комплекса Гольджи лишены рибосом.

На седьмой стадии, одновременно с гипертрофией фолликулярных клеток вокруг ооцита, в базальной части цитоплазмы появляются их концентрические мембранные системы (КМС) /23/. В центре такой системы наблюдается гомогенная или наполненная рибосомами сердцевина, которая окружена слоями (1-4) цистерн шероховатой цитоплазматической сети. На стадии возникновения КМС тесно прилегают к зоне комплекса Гольджи, со стороны которого они оказываются открытыми; иногда концентрические цистерны окружают и сам комплекс Гольджи. Зона комплекса Гольджи на рассматриваемой стадии увеличена и содержит в большом количестве мелкие пузырьки. Новым компонентом комплекса Гольджи являются более крупные вакуоли. Заметно увеличено в клетках также количество митохондрий и полирибосом.

Описанные здесь КМС соответствуют эпителиальным тельцам,

найденным Кингом и сотрудниками /4, 6/. Наши наблюдения показывают, что КМС возникают гораздо раньше, уже при подготовке фолликула к белковому вителлогенезу, а не лишь во время образования вителлиновой оболочки (9-ая стадия). Обнаруженная тесная связь комплекса Гольджи с образующимися КМС указывает на возможную роль этого комплекса как организующего центра при формировании цитоплазматических мембранных систем / 23 /. Следует обратить внимание на своеобразие комплекса Гольджи: отсутствие плоских цистерн и существование особого основного матрикса, четко отличаемого и резко отграниченного от остального цитоплазматического матрикса.

На первой стадии вителлогенеза (8-я стадия) фолликулярные клетки на поверхности ооцита преимущественно в своей базальной части содержат несколько (2-3) крупных КМС, имеющих 5-8 слоев цистерн шероховатой цитоплазматической сети (рис. 2), цистерны эти местами расширены. Возникающие таким образом вздутия со светлым содержимым располагаются, в частности, на поверхности КМС. Сердцевина КМС является по-прежнему или гомогенной с варьирующей плотностью, или наполненной рибосомами. Единичные КМС встречаются и в фолликулярных клетках, покрывающих питательные клетки, но они имеют гораздо меньшие размеры (не более 2-3 слоев). Присутствие КМС в этих клетках свидетельствует тоже о том, что функция их не связана только с образованием вителлиновой оболочки. Комплекс Гольджи обнаруживается в виде отдельных увеличенных зон (2-4 на одну клетку, по 1-5 мкм), в гомогенном матриксе которых наблюдаются многочисленные плотные пузырьки и весьма характерные для этой стадии крупные и светлые вакуоли. На краю комплекса Гольджи часто наблюдаются контакты цистерн шероховатой цитоплазматической сети с пузырьками комплекса. У базальной мембраны часто обнаруживаются пиноцитозные впячивания плазматической мембраны и пиноцитозные пузырьки (рис. 3). Диффузно в цитоплазме, особенно в зоне контакта с ооцитом, встречается много пузырьков и вакуолей. В периферийной оплазме непосредственно под зоной контакта с фолликулярными клетками появляется множество пиноцитозных пузырьков, сливающихся с растущими желточными гранулами.

Ультраструктурная организация фолликулярных клеток, окружающих ооцит на этой стадии, является характерной для интенсивно белок-синтезирующей и секреторирующей клетки. Это за-

ключение согласуется с наблюдениями Маговальда /10/. Кроме того, КМС проявляют весьма активное пиноцитозное всасывание веществ из гемолимфы.

На следующей (9-ой) стадии КМС уменьшаются в размерах. Их цистерны являются фрагментами и отчасти сильно расширенными. Количество слоев концентрических цистерн уменьшено до 2-4 (рис. 3). На 10-ой стадии наблюдаются вакуоли с гомогенным плотным содержанием, окруженные только одной шероховатой цистерной или только одной мембраной. В это же время в клетках увеличено количество отдельных цистерн шероховатой цитоплазматической сети (рис. 4). Зоны комплекса Гольджи являются более гомогенными и меньшими по сравнению с предыдущей стадией. В них количество мембранных компонентов, в частности светлых вакуолей, уменьшено. Цитоплазма значительно везикулизируется, нередко наблюдаются аутолизосомы (рис. 5). Особенно много лизосом на последних стадиях оогенеза (II-III) обнаруживается в тех фолликулярных клетках, которые лежат на питающих клетка.

Структурная динамика трофцитов

Нами изучено структурное состояние цитоплазмы питающих клеток яичевой камеры дрозофилы от 4-ой до 13-ой стадии оогенеза. На начальных стадиях (4-6) оогенеза питающие клетки отличаются изобилием свободных рибосом и множеством мелких митохондрий с типичной структурой и равномерным распределением, но отсутствием цитоплазматической сети и недоразвитым комплексом Гольджи. Непосредственно до начала вителлогенеза (на 7-ой стадии) обнаруживается некоторое уплотнение матрикса митохондрии, гипертрофия комплекса Гольджи и появление многочисленных липидных капель. Синтез липидов в трофocyтах, очевидно, связан с функцией комплекса Гольджи. Нередко вокруг зоны комплекса Гольджи наблюдаются группы липидных капель, многие из которых окружены двойными гранулярными мембранами (рис. 6). Возможно, в этих каплях до переноса в ооцит скапливается и некоторое количество белка.

С началом вителлогенеза (на 8-ой стадии) наблюдается продолжающаяся гипертрофия комплекса Гольджи и увеличение размеров и количества митохондрий, а также липидных капель. Комплекс Гольджи питающих клеток обнаруживает такое же

строение, как и фолликулярные клетки. Вокруг зоны Гольджи на этой стадии выявляются единичные цистерны гранулярной цитоплазматической сети.

На следующих стадиях (9-II) в цитоплазме питающих клеток, в частности в периферийных участках, граничащих с фолликулярными клетками, образуются локальные скопления митохондрий, содержащих и липидные капельки. Митохондрии в таких скоплениях постепенно все больше уплотняются, их матрикс становится очень темным. Различаются две популяции таких митохондрий, образующих отдельные очаги. В одном случае в плотном матриксе митохондрий появляются светлые "глазки", в другом случае - еще более плотные, сверхконтрастные зернышки (рис. 7 и 8). Эти периферийные участки питающих клеток плотно окружаются фолликулярными клетками, тонкие цитоплазматические отростки которых вклиниваются между питающими клетками (рис. 8). Комплекс Гольджи на этих стадиях развития редуцируется.

На конечных стадиях (I2-I3) вителлогенеза питающие клетки распадаются. Участки их цитоплазмы, содержащие видоизмененные митохондрии, подвергаются структурной деградации и миелоидному превращению. Наблюдаются митохондрии на разных стадиях разложения, в основной цитоплазме исчезают рибосомы и липидные капли и весь участок наполняется концентрическими миелоидными образованиями (рис. 9 и I0). В этом процессе распада и структурного перерождения цитоплазматических участков питающих клеток участвует функциональная активность лизосомальной системы. Такие участки преобразованной цитоплазмы питающих клеток поглощаются ооцитом.

Р о л ь ф о л л и к у л я р н ы х к л е т о к в в и т е л л о г е н е з е

Наши наблюдения показывают, что фолликулярные клетки обладают в начале вителлогенеза признаками белок-секретирующих клеток. Эти клетки содержат КМС, которые характерны клеткам с интенсивным синтезом секретируемого белка (напр., ацинарным клеткам поджелудочной железы). Следует подчеркнуть, что эти структуры появляются в фолликулярных клетках раньше, чем это показано в литературе /4, 6/. Кроме того, фолликулярные клетки имеют гипертрофированный комплекс Гольджи и секреторные пузырьки в апикальных частях. На основе этого можно зак-

лчить, что фолликулярные клетки весьма активно участвуют в синтезе желточного белка.

Другой аспект деятельности фолликулярных клеток в вителлогенезе выявляется изучением транспорта экзогенной пероксидазы. Уже после 10-минутной инкубации, пероксидаза обнаруживается в мелких пузырьках комплекса Гольджи. В это время такие комплексы с пероксидазой в пузырьках находятся вблизи базальной мембраны (рис. 11). После более длительной инкубации, пероксидаза обнаруживается уже в комплексах Гольджи, которые находятся в более апикальных частях фолликулярных клеток (рис. 12). Остается впечатление о постоянном направленном перемещении отдельных комплексов Гольджи в цитоплазме. В межклеточных пространствах фолликулярного эпителия пероксидаза не наблюдается или выявляется она там в очень незначительных количествах.

Пузырьки с пероксидазой обнаруживаются в периферии ооплазмы со стадии развития 8 (после 30-минутной инкубации). Имеются все переходные формы пузырьков между солеммой и желточными гранулами (рис. 13).

Эти данные доказывают, что фолликулярные клетки активно Pinoцитируют экзогенные для фолликула белки, которые могут быть непосредственно отложены в составе желтка в ооците. То, что экзогенный белок транспортируется трансцеллюлярно, объясняет и избирательную роль фолликулярных клеток на всасываемые из гемолимфы вещества, участвующие в вителлогенезе.

Р о л ь ф о л л и к у л я р н ы х к л е т о к в р а з л о ж е н и и т р о ф о ц и т о в

Во время оогенеза в трофоцитах накапливаются рибосомы, митохондрии и в меньшей мере другие органеллы. Лизосомы немногочисленные. Кислая фосфатаза выявляется только в периферии своеобразных гомогенных телец и в пузырьках комплекса Гольджи (рис. 14). В фолликулярных клетках количество лизосом увеличивается в течение стадий развития 9-12. В клетках, соседствующих с трофоцитами, появляются многочисленные плотные тельца и аутолизосомы. Сами фолликулярные клетки сильно гипертрофируются и вклиниваются между трофоцитами (рис. 8). На стадии 12 активность кислой фосфатазы резко увеличивается. Продукт реакции обнаруживается многочисленными отложе-

ниями как в фолликулярных клетках, так и в трофоцитах (рис. 15). В фолликулярных клетках наблюдаются крупные очаги дегенерации, а содержимое лизосом и расширенных цистерн гранулярной цитоплазматической сети секреторируется в участки трофоцитов, охватываемые фолликулярными клетками (рис. 16). Цитоплазма трофоцитов уплотняется и превращается в миелоидные фигуры (рис. 10).

Заключение

На основе электронномикроскопического исследования яйцевой камеры дрозофилы нами установлено следующее:

1. Впервые описано наличие кольцевидных канальцев между фолликулярными клетками. Вполне возможно, что такие интерцеллюлярные коммуникации являются необходимыми для синхронного развития отдельных клеточных популяций.

2. Появление и гаметрофия концентрических мембранных систем в фолликулярных клетках обнаружены гораздо раньше, чем это предполагается по литературным данным. Благодаря этому роль таких структур хорошо увязывается с вителлогенезом. Такие цитологические особенности наряду с другими превращают фолликулярные клетки во время образования желтка в типичные белоксекретирующие клетки.

3. Экзогенная пероксидаза, которая включается в состав желтка, транспортируется через фолликулярные клетки при пиноцитозной и секреторной активности этих клеток. Такое открытие указывает на их возможную роль в качестве избирательного фильтра.

4. При распаде трофоцитов на конечных стадиях оогенеза органеллы их, в частности митохондрии, не вступают в состав опслазмы в целостном виде, а подвергаются тщательному аутолизису с помощью лизосомных ферментов и при участии фолликулярных клеток.

Л и т е р а т у р а

1. Cummings M.R., King R.C. The cytology of the vitellogenic stages of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. General staging characteristics. "J.Morphol.", 1969, 128, 427-442.
2. Bier K. Zur Funktion der Nährzellen im meristotischen Insektenovar unter besonderer Berücksichtigung der Oogenese adephager Coleopteren. "Zool. Jb", 1965, 71, 3, 371-384.
3. Bier K. Oogenesetypen bei Insekten und Vertebrate, ihre Bedeutung für die Embryogenese und Phylogenese. "Zool. Anz.", 1970, Suppl. 33, 7-29.
4. King R.C., Koch E.A. Studies on the ovarian follicle cells of *Drosophila*. "Quart. J. micr. Sci.", 1963, 104, 3, 297-320.
5. Cummings M.R., King R.C. The cytology of the vitellogenic stages of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Ultrastructural investigations on the origin of protein yolk spheres. "J. Morphol.", 1970, 130, 4, 467-478.
6. Cummings M.R., King R.C. Ultrastructural changes in nurse and follicle cells during late stages of oogenesis *Drosophila melanogaster*. "Z. Zellforsch.", 1970, 110, 1-8.
7. King R.C. The cell cycle and cell differentiation in the *Drosophila* ovary. "Results and Problems in Cell Differentiation", Berlin-Heidelberg-New York, 1975, 7, 85-109.
8. Brown E.H., King R.C. Studies on the events resulting in the formation of an egg chamber in *Drosophila melanogaster*. "Growth", 1964, 28, 41-81.
9. King R.C. Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. IX. Studies on the cytochemistry and ultrastructure of developing oocytes. "Growth", 1960, 24, 265-323.
10. Mahowald A.P. Ultrastructural observations on oogenesis in *Drosophila*. "J. Morphol.", 1972, 137, 29-48.

11. Айзенштадт Т.Б. Рост ооцитов и вителлогенез. В кн.: *Современные проблемы оогенеза*. М., "Наука", 1977, 5-50.
12. Bier K. Autoradiographische Untersuchungen über die Leistungen des Follikel­epithels und der Nährzellen bei der Dotterbildung und Eiweissynthese im Fliegenovar. "Roux' Archiv Entw.-mech. Organismen", 1963, 154, 6, 552-575.
13. Telfer W.H. The selective accumulation of blood proteins by the oocytes of saturniid moths. "Biol.Bull.", 1960, 118, 2, 338-351.
14. Telfer W.H. The mechanism and control of yolk formation. "Rev. Entomol. U.S.A.", 1965, 10, 161-184.
15. Anderson W.A., Spielman A. Permeability of the ovarian follicle of *Aedes aegypti* mosquitoes. "J. Cell Biol.", 1971, 50, 1, 201-221.
16. Huebner E., Tobe S.S., Davey K.G. Structural and functional dynamics of oogenesis in *Glossina austeni*: vitellogenesis with special reference to the follicular epithelium. "Tissue and Cell", 1975, 7(3), 535-558.
17. Anderson L.M., Telfer W.H. A follicle cell contribution to the yolk spheres of moth oocytes. "Tissue and Cell", 1969, 1, 4, 633-644.
18. Chia W.K., Morrison P.E. Autoradiographic and ultrastructural studies on the origin of yolk protein in the housefly, *Musca domestica* L. "Can. J. Zool.", 1972, 50, 1569-1576.
19. Cruickshank W.J. Ultrastructural modification in the follicle cells and egg membranes during development of flour moth oocytes. "J. Insect. Physiol.", 1972, 18, 485-498.
20. Bennett H.S., Luft J.H. S-collidine as a basis of buffering fixatives. "J. biophys. biochem. cytol.", 1959, 6, 113-114.
21. Reynolds E.S. The use of lead-citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. "J. Cell Biol.", 1963, 17, 208-212.

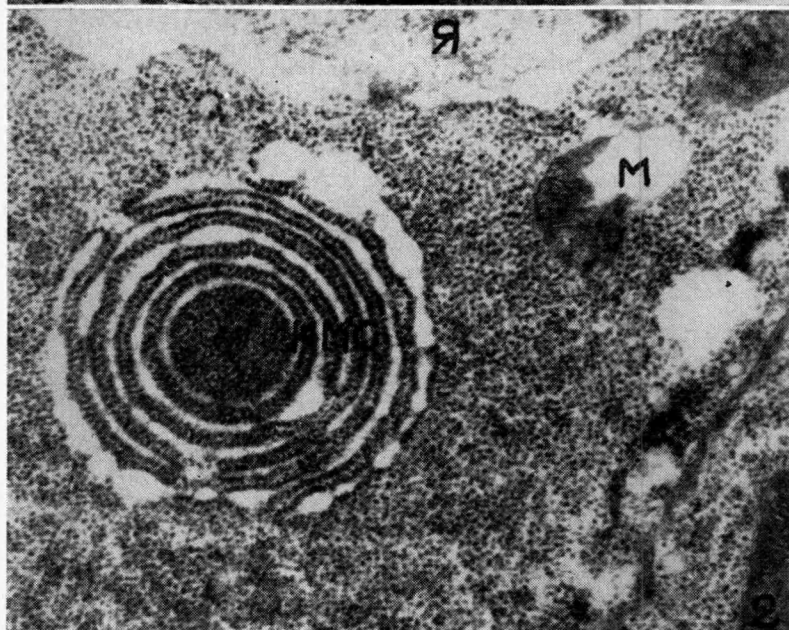
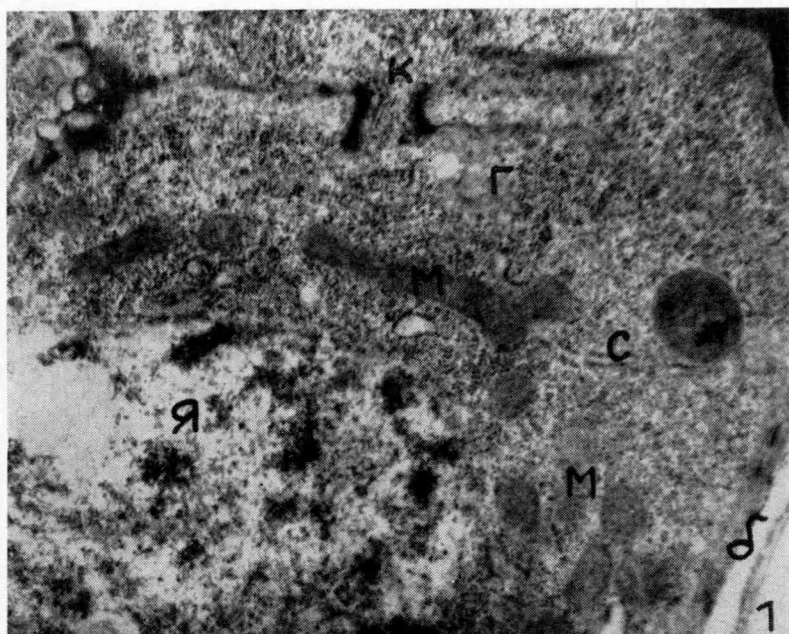


Рис. 1. Кольцевидный каналец (к) между фолликулярными клетками на 7-ой стадии. я — ядро, м — митохондрий, г — комплекс Гольджи, с — цистерны цитоплазматической сети, б — базальная мембрана. 25400X.

Рис. 2. Концентрическая мембранная система (кмс) в фолликулярной клетке на 8-ой стадии. Обозначения, как на рис. 1. 28500X.

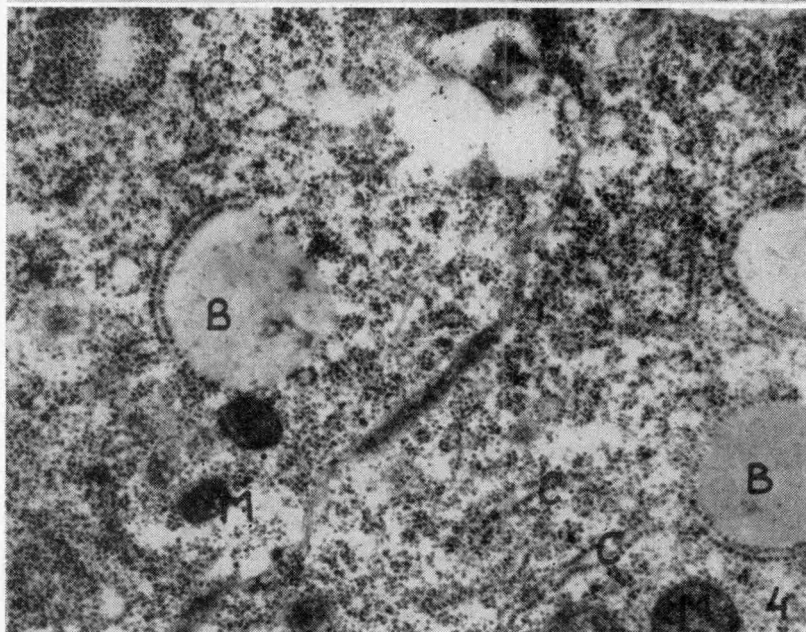
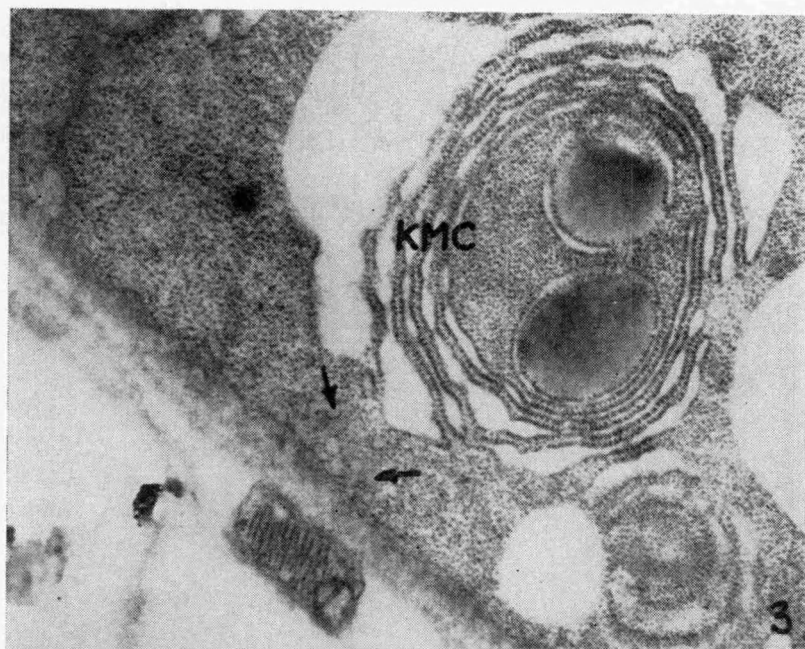


Рис. 3. Концентрическая мембранная система (кмс) в фолликулярной клетке на 9-ой стадии. Стрелки указывают на пиноцитозные пузырьки и впячивания базальной плазматической мембраны. 27000X.

Рис. 4. Фолликулярные клетки на 10-ой стадии. в — липидные вакуоли, окруженные цистерной цитоплазматической сети. Остальные обозначения, как на рис. 1. 28500X.

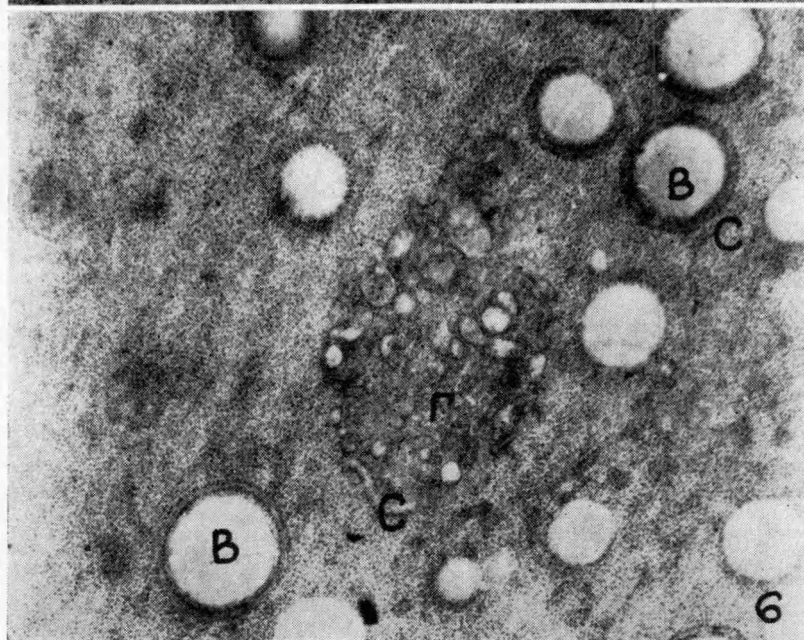
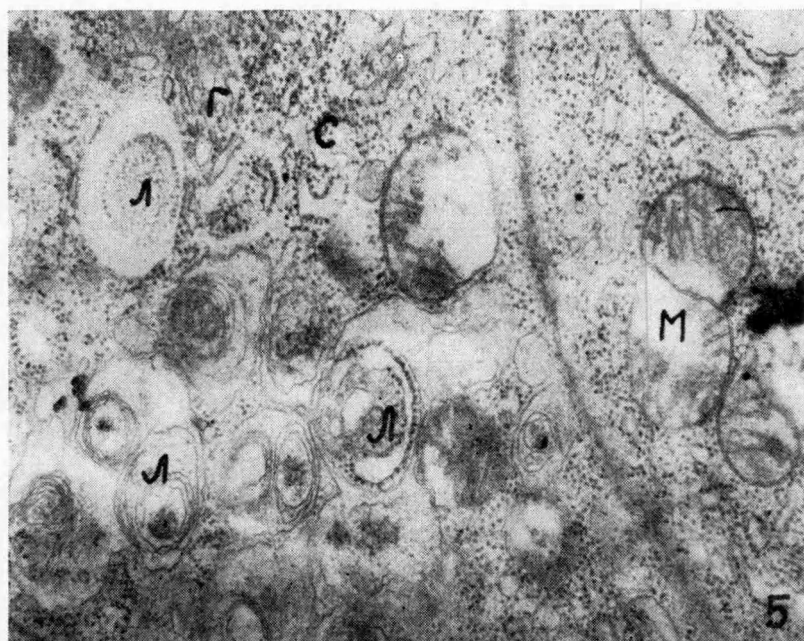


Рис. 5. Многочисленные аутолизосомы (л) в фолликулярных клетках на 10-ой стадии. Остальные обозначения, как на рис. 1. 28500X.

Рис. 6. Липидные вакуоли (в) в питающей клетке на 7-ой стадии. Остальные обозначения, как на рис. 1. 20000X.

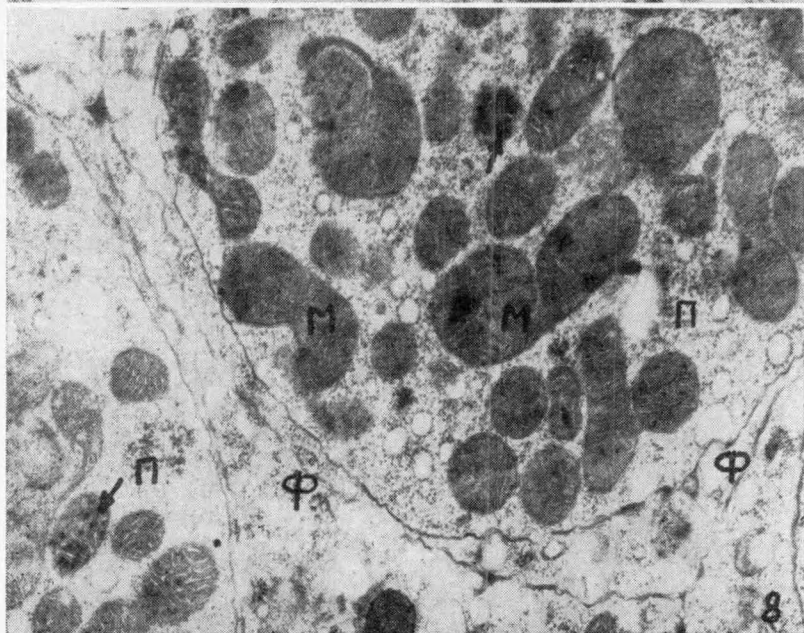
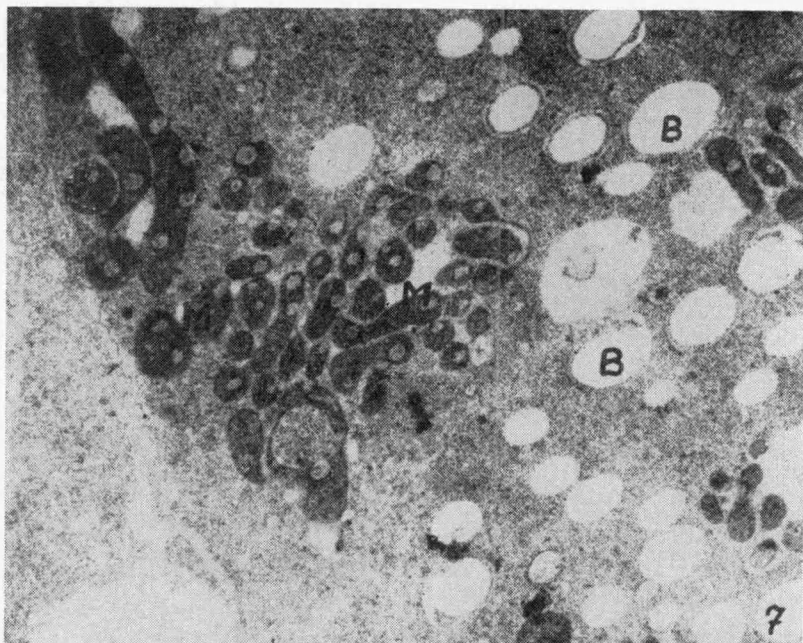


Рис. 7. Скопления митохондрия (м) и липидных вакуолей (в) в питающей клетке на 9-ой стадии. ф — фолликулярная клетка. 20000X.

Рис. 8. Участки питающих клеток (п), разделенные отростком фолликулярной клетки (ф). Стрелки указывают на сверхконтрастные зернышки в митохондриях (м). 28000X.

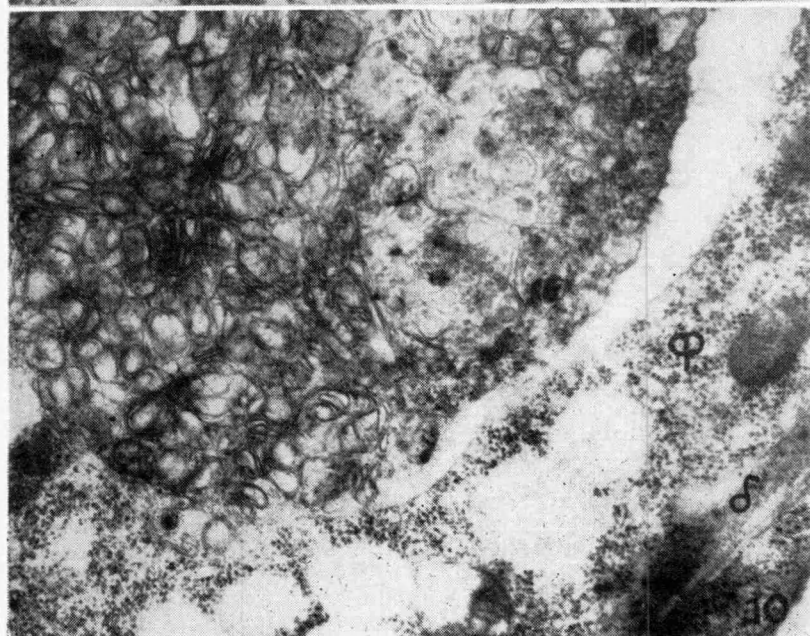
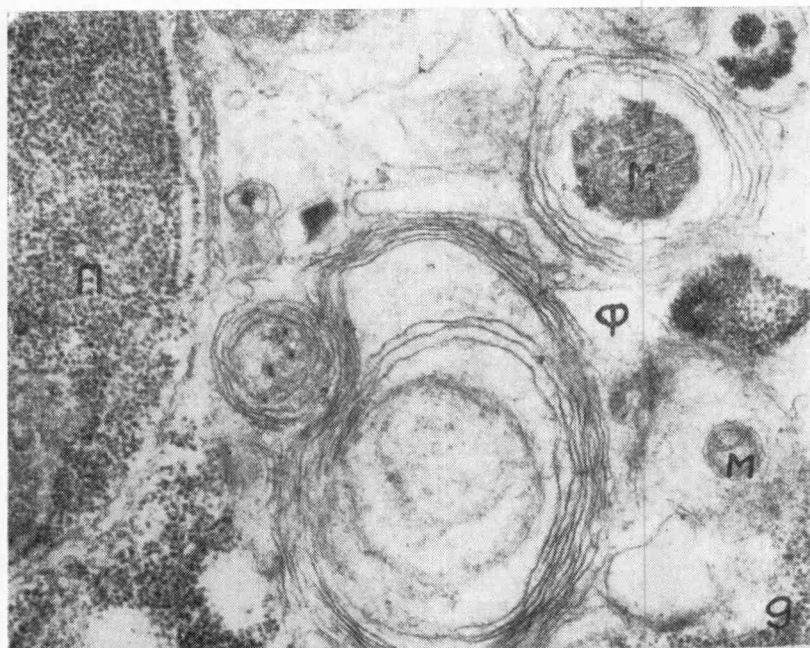


Рис. 9. Миелоидное превращение в фолликулярной клетке (ф), окружающей периферический участок питающей клетки (п). я — ядро, м — остатки митохондрия. 35000X.

Рис. 10. Превращение периферийного участка питающей клетки в массу миелоидных фигур. ф — фолликулярная клетка, б — базальная мембрана. 28000X.

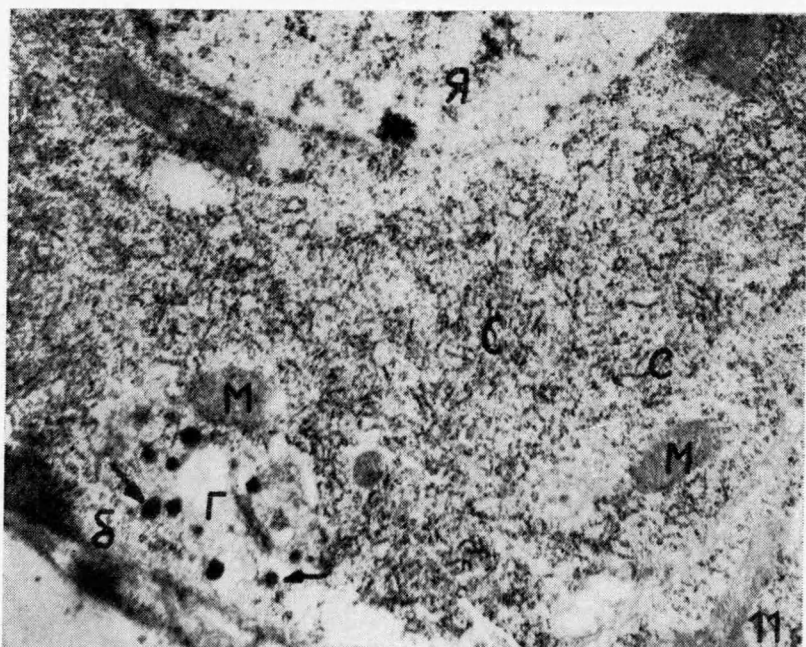


Рис. 11. Фолликулярная клетка с экзогенной пероксидазой в пузырьках комплекса Гольджи (стрелки) вблизи базальной мембраны. Инкубация в растворе пероксидазы — 10 мин. Остальные обозначения, как на рис. 1. 25000X.

Рис. 12. Экзогенная пероксидаза в пузырьках комплекса Гольджи (стрелки) в более апикальной части фолликулярных клеток. Инкубация в растворе пероксидазы — 30 мин. Остальные обозначения, как на рис. 1. 25000X.

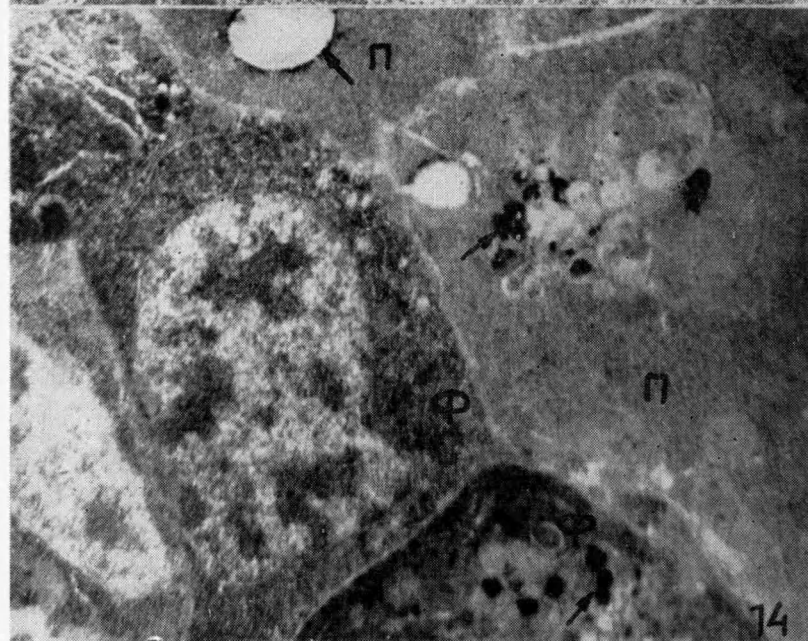
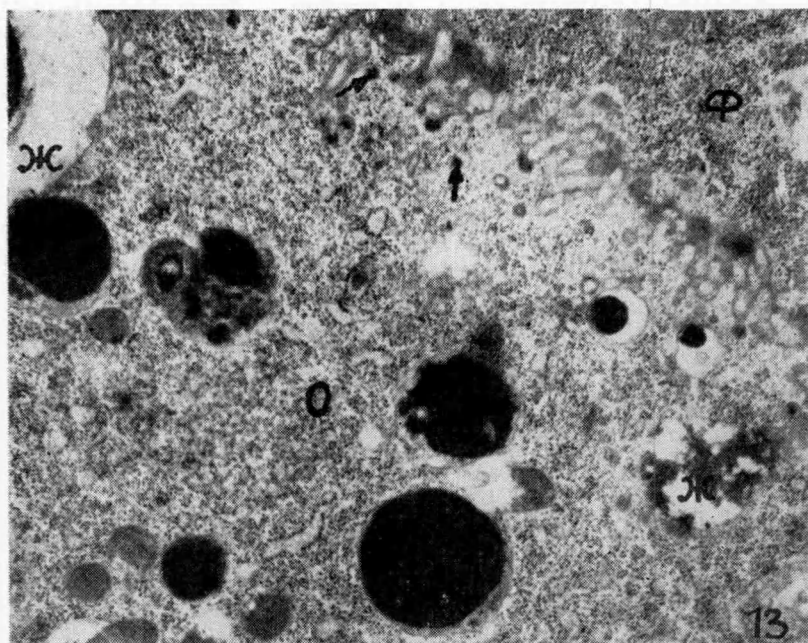


Рис. 13. Накапливание экзогенной пероксидазы в пиноцитозных пузырьках и в желточных гранулах ооцита. Инкубация в растворе пероксидазы — 30 мин. ф — фолликулярная клетка, о — ооцит, ж — желточные гранулы, стрелками показаны пиноцитозные пузырьки. 25000 \times .

Рис. 14. Распределение кислой фосфатазы (стрелки) в фолликулярных (ф) и питающих (п) клетках на 10-ой стадии. 22400 \times .

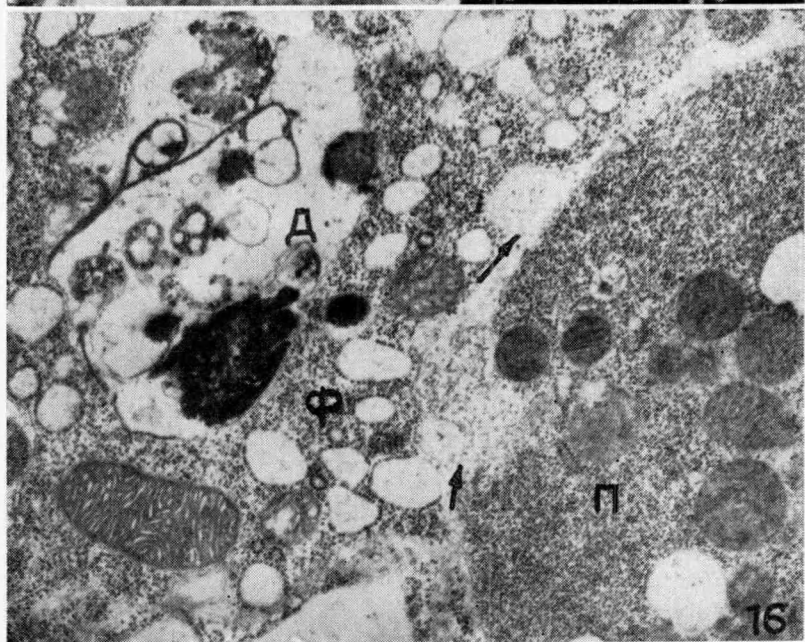
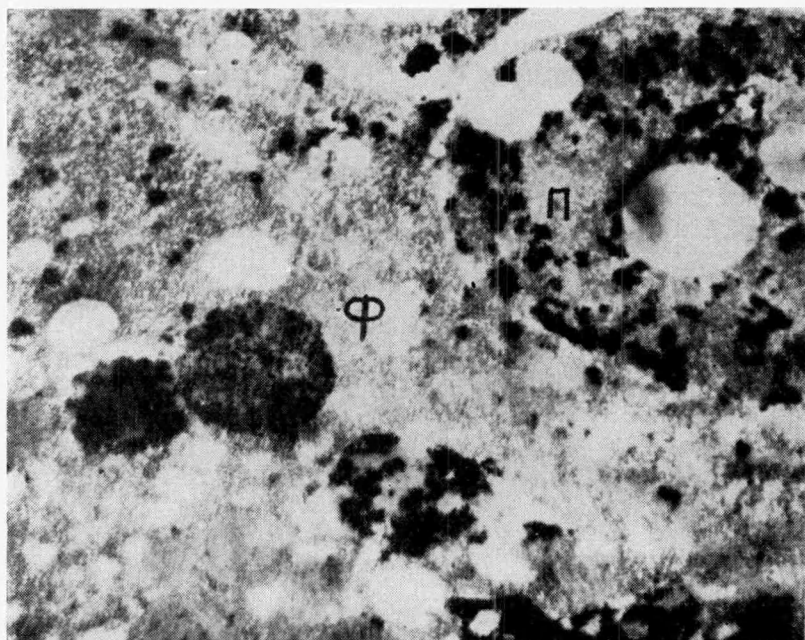


Рис. 15. Распределение кислой фосфатазы (стрелки) в фолликулярных (Ф) и питающих (П) клетках на 12-ой стадии. 25000 \times .

Рис. 16. Крупные очаги деградации (Д) в фолликулярной (Ф) клетке на 12-ой стадии. Содержимое лизосом и цистерн цитоплазматической сети секретируется (стрелки) в периферийный участок питающей клетки (П). 25000 \times .

22. Karnovsky M.J. Vesicular transport of exogenous peroxidase capillary endothelium into the T-system of muscle. "J. Cell Biol.", 1965, 27, 49A.
23. Виикмаа М., Кярнер Д., Оямаа М. Ультраструктура фолликулярных клеток яичевой камеры дрозофилы на начальных стадиях вителлогенеза. Известия АН ЭССР. Том 24. Биология, 1975, 2, 141-145.

On differentiation and function of trophocytes
and follicle cells in *Drosophila* egg chamber

M. Viikmaa, J. Kärner

S u m m a r y

Ultrastructural dynamics, the distribution of acid phosphatase and exogenous peroxidase of trophocytes and follicle cells in *Drosophila melanogaster* egg chamber during stages 4 to 10 were studied. Similarly to trophocytes some follicle cells were connected by ring canals usually observed during synchronous cellular development. Immediately before the beginning of vitellogenesis multi-layered concentric system of the cisternae of granular cytoplasmatic retikulum were observed in follicle cells. All cytological features of follicle cells were typical of protein secretion. At the same time exogenous peroxidase which accumulated into yolk granules was transported through follicle cells by means of pinocytotic vesicles. During the last stages of oogenesis trophocytes were destroyed by lysosomal enzymes, a part of which was apparently produced and secreted by follicle cells.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЛИТЕЛЬНО КУЛЬТИВИРОВАННОГО КАЛЛУСА КРЕПИСА

Х.И. Каллак, М.А. Вапшер

Многие авторы указывают на повышенную карiotипическую изменчивость растительных клеток и тканей в условиях культуры /1-16/. Разумеется, следствием изолирования клеток (и тканей) от цельного организма является нарушение надклеточных регуляторных систем, ведущее к некоторым отклонениям от нормальных жизненных процессов, в том числе и от закономерной репродукции клеток и хромосом. Появляются аберративные митозы и различные измененные карiotипы. Наблюдения об изменчивости хромосомных наборов *in vitro* привели некоторых исследователей даже к заключению, что в карiotипической изменчивости господствует полная случайность.

Однако в связи с расширением цитогенетических исследований растительных культур тканей становится все более ясно, что представление о случайных флуктуациях в числе и строении хромосом *in vitro* преувеличено. В карiotипической изменчивости клеточных популяций, особенно длительно пассируемых культур, проявляются определенные тенденции и формируются штаммы и линии с относительно стабильными модалными карiotипами. Часто описывается тенденция к полиплоидии /14, 17-20/, но известны и случаи увеличения числа гаплоидных и диплоидных клеток /13, 20-22/. По некоторым данным, первоначально карiotипически нестабильная культура со временем превращается в стабильный штамм с определенным модалным карiotипом или дифференцируется в несколько различных клеточных линий /23, 24/. Результаты других исследований свидетельствуют о потере стабильной степени плоидности в течение длительного культивирования /7, 19/. Отмечена и флуктуация степени плоидности в длительных культурах /8/.

Crepis capillaris цитогенетически хорошо исследованный непалисоматический вид, отличающийся стабильным карiotипом *in vivo*. Цитогенетические исследования каллусных культур креписа свидетельствуют также об относительной стабильности хромосомных наборов *in vitro*. Указывают на преобладание диплоидных клеток в течение 1-1,5-летнего культивирования

/23, 25-27/ и на низкую частоту (0,5-5,9%) аберративных ана- и телофаз /27, 28/. По данным Кулиевой и Шаминой /29/, даже в 4-летней культуре креписа около 50% диплоидных клеток, тогда анеуплоидных клеток и хромосомных аберраций не обнаружено. На отсутствие анеуплоидных наборов и аберраций указывают также Зосимович и др. /23/. Зато в последней работе описана дифференцировка первоначально диплоидной каллусной культуры креписа в отдельные штаммы с различной степенью плоидности после однолетнего культивирования *in vitro*. По данным Сакристана /24/, в каллусной культуре, изолированной от опухолевых тканей креписа, в течение первого года обнаруживаются нестабильные миксоплоидные клеточные популяции, из которых после 4-летнего культивирования дифференцируются карiotипически стабильные клеточные линии с различными аберративными хромосомами.

Из представленных данных следует, что цитогенетический анализ каллусных культур креписа проведен или только в течение I-I,5 года /23, 25-27, 30/, или в отдельной субкультуре более старшей культуры /29/; при метафазном анализе ограничивались учетом числа хромосом /23, 25, 26, 29/ или не провели анафазного анализа /24, 27/.

Целью данной работы стала цитогенетическая характеристика длительно культивируемой каллусной культуры креписа, применяя одновременно метафазный и анафазный методы анализа, учитывая как число, так и перестройки хромосом.

Материал и методика

Объектом исследования служил каллусный штамм креписа (*Streptis capillaris* (L.) Wallr.), изолированный от проростков и культивированный в течение 4,5 лет на агаровой среде по Мурасиге и Скугу с соответствующими добавками (I мг/л 2,4-Д, I мг/л аденина, 500 мг/л гидролизат казеина и др.). Культура выращивалась в темноте при температуре 26-27°C. В первые два года культивирования каллус рос медленно и перепассировался только через 2-3 месяца, потом - через каждые 4-5 недели. Для цитогенетических исследований каллусную ткань фиксировали смесью этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1) и приготавливали давленные препараты стандартным методом ацеторсеина. Исследовали число и строение метафазных хромосом и

определили количество аберративных ана- и телофаз. В каждом исследованном пассаже анализировали 200-600 метафаз и 200-700 ана- и телофаз. Данные обработаны статистически. 95%ные доверительные границы найдены при помощи критерия Фишера.

Результаты исследований

В нормальном диплоидном кариотипе креписа три пары гомологичных хромосом: одна пара длинных субметацентрических хромосом (А), одна пара средних акроцентрических хромосом со спутником (Д) и одна пара маленьких субметацентрических хромосом (С).

Цитогенетическое исследование каллусной ткани креписа в течение 4,5-летнего культивирования показало, что в числе и строении хромосом каллусных клеток могут произойти различные изменения. Основные кариотипы подопытного каллусного штамма креписа представлены на рисунках 1, 2 и 3. Можно заметить, что рядом с нормальными диплоидными кариотипами встречаются аберративные диплоидные кариотипы (рис. 1). Обнаруживаются гипердиплоидные кариотипы с 7-8 хромосомами, имеющими различные аберрации (рис. 2). Встречаются также метафазы с 12 и более хромосомами (рис. 3). Подробный анализ представленного на рисунке 3^а набора выявляет в нем различные аберративные хромосомы, не встречающиеся в нормальном кариотипе креписа.

Представленные рисунки позволяют сделать вывод, что изученный каллусный штамм креписа характеризуется нестабильными кариотипами. Однако количественный анализ метафаз в течение 4,5-летнего культивирования (до 35-го пассажа) показал, что, несмотря на некоторую вариабельность кариотипов, выявляются определенные тенденции в изменениях соотношений разноплоидных каллусных клеток. Результаты исследований представлены на рисунке 4. По нашим данным, изолирование и выращивание изолированной каллусной ткани креписа *in vitro* ведет сперва к заметным изменениям в числе хромосом. В первых пассажах явно преобладают полиплоидные ($4x$ и $> 4x$) клетки, но в течение культивирования их количество постепенно уменьшается. Если в первом пассаже тетраплоидные и более чем тетраплоидные клетки составляют около 85% из популяции делящихся клеток, то в пятом пассаже таких клеток около 42% и начиная с

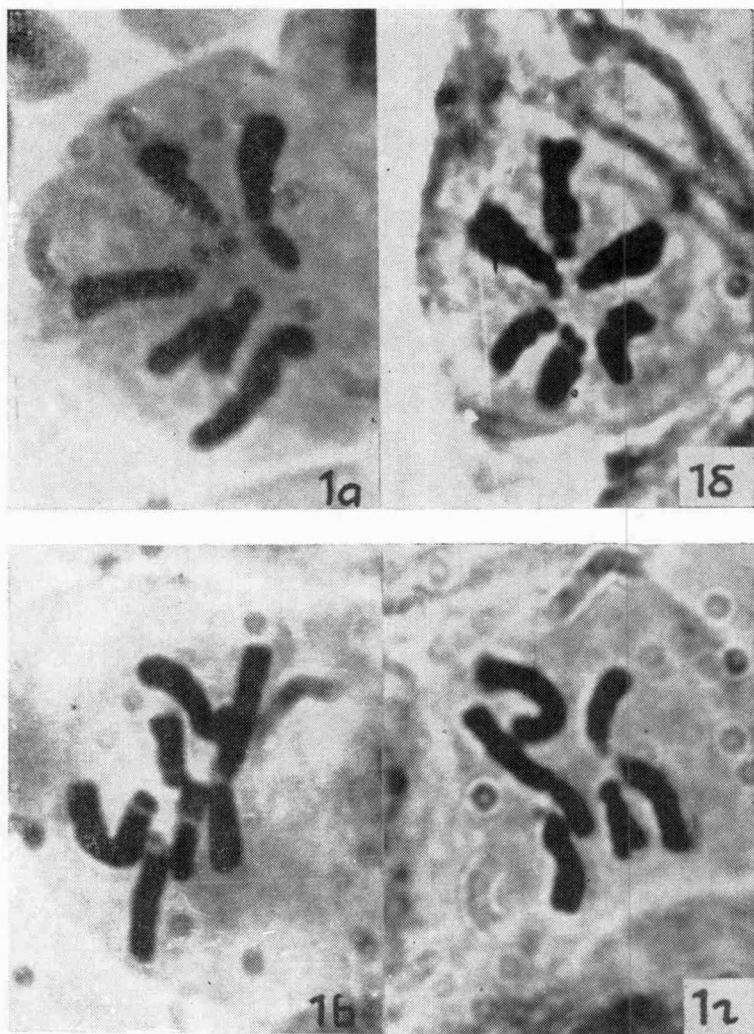


Рис. 1. Каллусные клетки клевера с шестью хромосомами: а) нормальный диплоидный кариотип, б), в), г) aberrантные кариотипы. $\times 2380$.

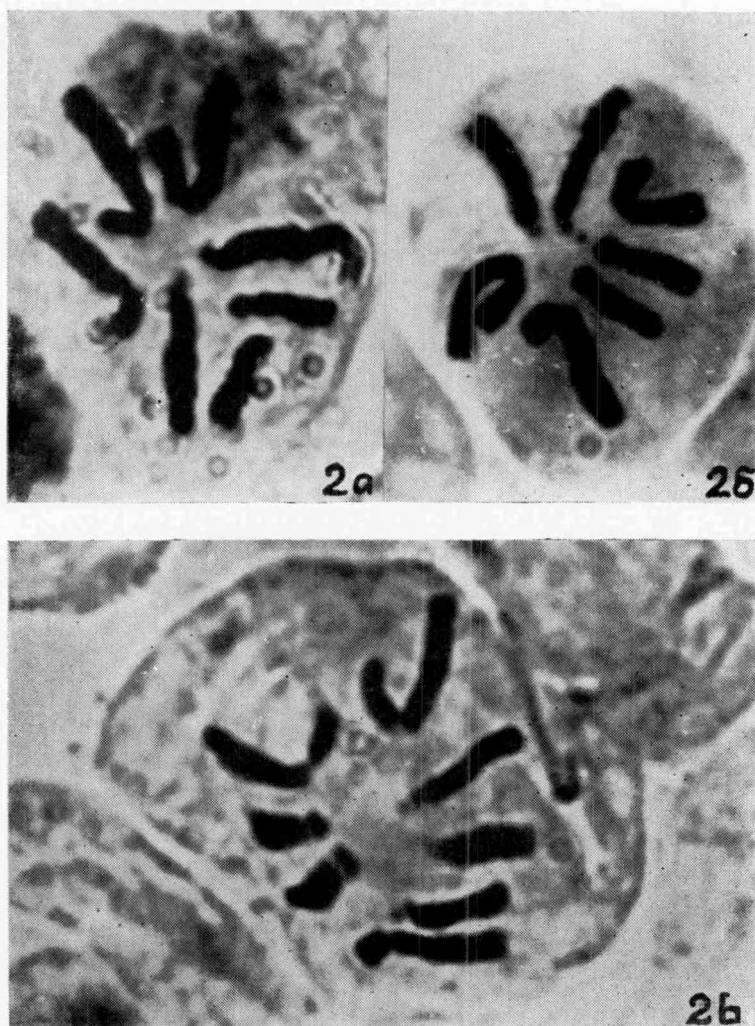


Рис. 2. Калусные клетки креписа с анеуплоидными наборами:
а) с семью хромосомами, б) с восьмью хромосомами. $\times 2380$.

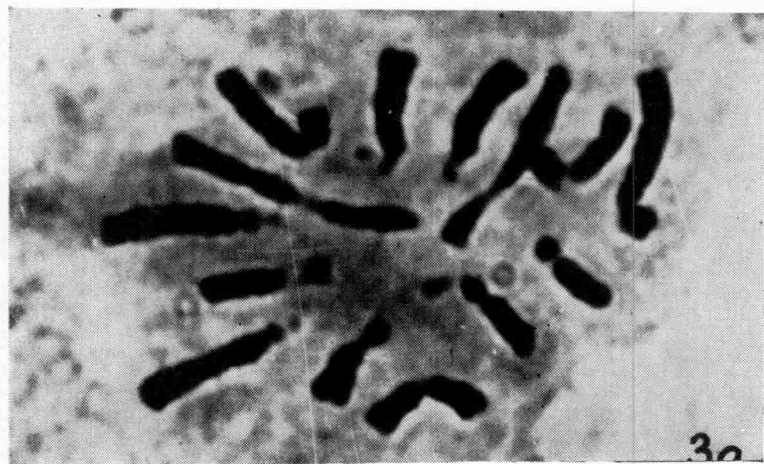


Рис. 3. Полиплоидные клетки в каллусе креписа: а) с 14 хромосомами, б) с К-митозом. $\times 2380$.

8-го пассажа они составляют всего 12-21% из изученных метафазных клеток. Диплоидные клетки в первом пассаже практически отсутствуют, их количество не превышает 2-4%. В следующих пассажах доля диплоидных клеток несколько увеличивается, достигая в восьмом пассаже 37%. Затем их количество снова падает и составляет в последних исследованных пассажах всего 8-11%.

Самой явной тенденцией карiotипической изменчивости каллусных клеток изученного штамма является увеличение и становление преобладающим количества клеток с гипердиплоидным набором хромосом. Клетки с 7 хромосомами появляются в 5-ом пассаже. В 8-ом и 12-ом пассажах они составляют 43-47%, а в следующих исследованных пассажах уже 60-70% из всех анализированных метафаз. Более подробный анализ гипердиплоидных клеток показал, что 78-80% из них имеют карiotип, представленный на рисунке 2а. В этом наборе имеются все три пары нормальных гомологичных хромосом креписа (А, С, Д) и одна добавочная аберративная хромосома. Седьмая хромосома, вероятно, образовалась в результате реципрокной транслокации и состоит из длинного плеча хромосомы С и длинного плеча хромосомы А (или Д).

Анализ ана- и телофаз исследованного каллусного штамма креписа выявил некоторые отклонения от нормального распределения хроматид: мосты, фрагменты, отстающие хромосомы (рис. 5). Наиболее характерной чертой ана- и телофаз этого штамма является асинхронное движение хроматид, вследствие чего часто встречаются ана- и телофазы с опоздавшими хроматидами (рис. 6а). В результате таких опоздавших хроматид и переживания мостов образуются полиморфные ядра самой причудливой формы (рис. 6б).

Результаты количественного анализа динамики аберративных ана- и телофаз в течение 4,5-летнего культивирования показаны на рисунке 7. К числу аберративных отнесены ана- и телофазы с мостами, фрагментами и отстающими хромосомами, не учитывая количества ана- и телофаз с опоздавшими хроматидами. По нашим данным, длительное культивирование ведет к снижению и стабилизации частоты аберративных ана- и телофаз в каллусных клетках креписа. Если в первом пассаже после изолирования каллусной ткани от эксклантатов частота аберративных ана- и телофаз достигает до 18%, то начиная с 8-го пассажа она не превышает 10%, колеблясь в пределах 4-9%.

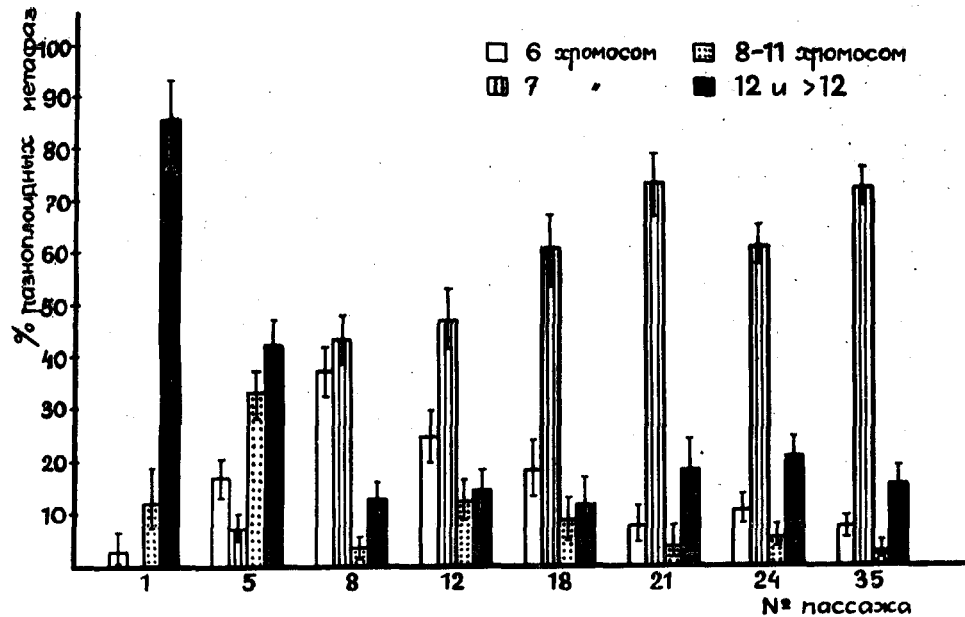


Рис. 4. Динамика степени пloidности в каллусной культуре кренгиса.

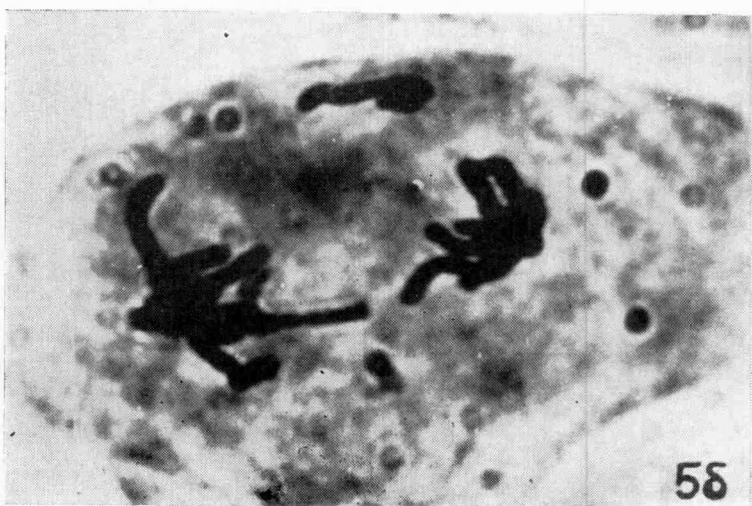


Рис. 5. Отклонения от нормального распределения хроматид в каллусных клетках креписа. $\times 2380$.

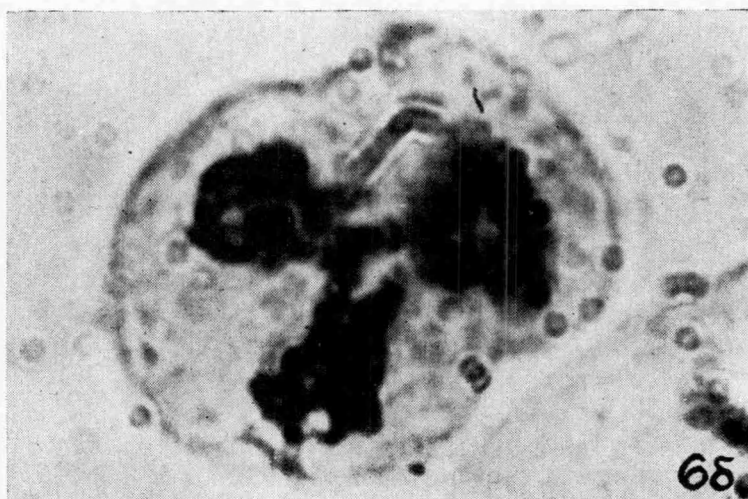
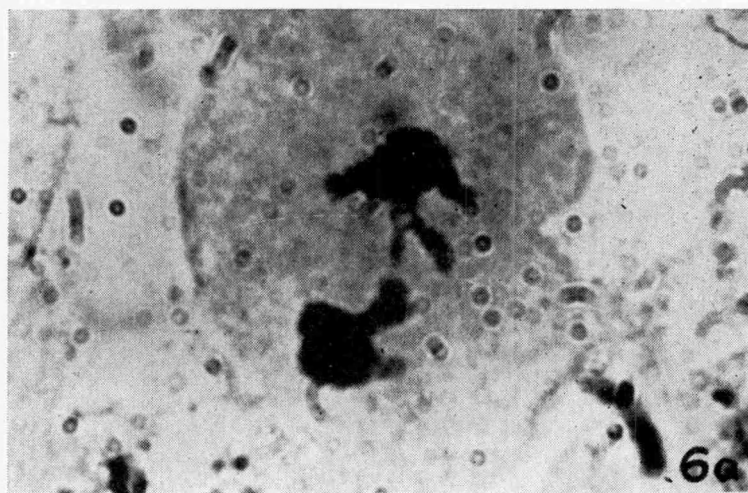


Рис. 6. Опаздавшие хромосомы в калусных клетках креписа: а) телофаза, б) полиморфные ядра. $\times 2380$.

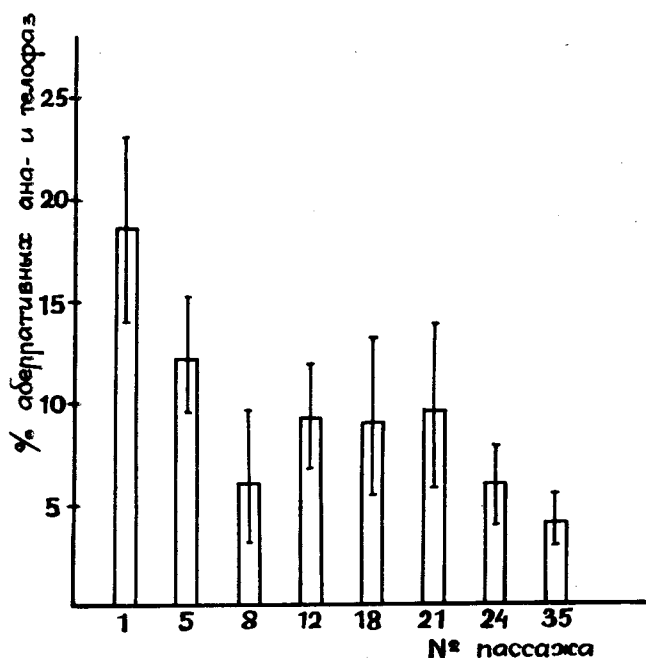


Рис. 7. Динамика частоты аберративных ана- и телофаз в каллусной культуре креписа.

Наряду с низкой частотой аберративных ана- и телофаз привлекает внимание сравнительно высокая и постоянная частота ана- и телофаз с опоздавшими хроматидами. В течение всего периода культивирования (от первого до 35-го пассажа) количество ана- и телофаз с опоздавшими хроматидами колебалось в пределах 30-40%.

Обсуждение

Проведенные исследования свидетельствуют о кариотипической изменчивости каллусных клеток креписа, рассматриваемого часто как кариотипически стабильный вид *in vivo* и *in vitro*. С другой стороны, исследованный каллусный штамм показывает, что в кариотипической изменчивости длительно культивируемых

тканей проявляются определенные направления, вследствие чего формируется относительно стабильный штамм с определенным модальным кариотипом. Модальный кариотип сформированного штамма, однако, не содержит диплоидное (или какое-нибудь другое еуплоидное) число хромосом, как можно было ожидать по литературным данным, а является анеуплоидным набором с одной добавочной аберративной хромосомой.

Дифференцировка стабильных клеточных линий с аберративными анеуплоидными кариотипами в длительной культуре креписа описана также Сакристаном /24/. Но в отличие от нашего штамма, изолированного от нормальной диплоидной ткани проростков, клеточные линии, исследованные Сакристаном, были получены от опухолевых тканей растений.

Особого внимания заслуживает большое количество полиплоидных ($4x$ и $> 4x$) клеток в исследованной нами каллусной культуре в течение первых пассажей. Появление полиплоидных клеток в каллусе непалисоматического вида в таком количестве может быть обусловлено явлениями эндоредупликации или К-митоза. В пользу К-митоза как возможного механизма полиплоидизации свидетельствуют митозы с диплохроматидами, обнаруженные в клетках исследуемого каллусного штамма (рис. 3б). Появление кариотипов с одной добавочной аберративной хромосомой, вероятно, результат аберраций и постепенной элиминации хромосом в полиплоидных наборах. Об этом свидетельствует постепенное уменьшение количества $4x$ -клеток в первых пассажах, а также относительно высокий процент (~ 33) анеуплоидных клеток с 8- II хромосомами в пятом пассаже. На постепенную элиминацию аберративных хромосом как на возможный механизм образования анеуплоидных клеточных линий указывает и Сакристан /24/.

Постепенное увеличение количества анеуплоидных клеток с определенным аберративным кариотипом говорит о преимущественном делении таких клеток в условиях данной культуры. О постоянной селекции как об основном направляющем факторе образования штаммов и клеточных линий в длительно пассируемых растительных культурах свидетельствуют и результаты исследований других авторов /4, 22, 23, 31-35/. Трудно только судить о сущности факторов отбора. Часто указывают на селективную роль компонентов среды. Однако исследованный каллусный штамм рос на одной и той же среде, в одинаковых условиях культивирования. Можно только предположить, что действуют

какие-то факторы внутриклеточного характера или в популяции каллусных клеток имеет место определенное межклеточное взаимодействие, приводящее к предпочтительному делению клеток с гипердиплоидным aberrативным карิโอтипом.

Выводы

1. В кариотипической изменчивости каллусной культуры, изолированной от проростков *Crepis capillaris* и выращенной в течение 4,5 лет на агаровой питательной среде по Мурашиге и Скогу, обнаруживаются определенные тенденции: в первых пассажах преобладают полиплоидные клетки ($4x$ и $>4x$), но начиная с пятого пассажа в каллусе появляются и постепенно становятся модальными клетки с анеуплоидным набором хромосом, состоящим из трех пар нормальных и одной aberrативной хромосомы.

2. Aberrативная хромосома образовалась, по-видимому, в результате реципрокной транслокации в полиплоидном наборе и состоит из длинного плеча хромосомы С и длинного плеча хромосомы А (или D).

3. Исследованная каллусная культура креписа характеризуется низкой и постоянной частотой (4-6%) aberrативных ана- и телофаз с мостиками и/или фрагментами, но относительно высокой частотой (~30-40%) ана- и телофаз с опоздавшими хромосомами.

Л и т е р а т у р а

1. Кунах В.А. Цитогенетическое изучение клеточных популяций в культуре изолированных тканей растений. Автореф. канд.биол.наук. Киев, 1975.
2. Фролова Л.В., Шамина З.Б. Цитогенетическая характеристика культуры тканей растений из семейства бобовых. - Цитология и генетика, 1974, 8, 413-418.
3. Шамина З.Б., Фролова Л.В. Цитогенетическое изучение культуры ткани галлопапуса при длительном культивировании. В кн.: Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. М., 1970, 149-154.

4. Bayliss, M.W. Origin of chromosome number variation in cultured plant cells. *Nature*, 1973, 246, 529-530.
5. Bayliss, M.W., Gould, A.R. Studies on the growth in culture of plant cells. *J. Exp. Bot.*, 1974, 25, 772-783.
6. Boyer, C.D., Shannon, J.C. Chromosome constitution and cell division in in vitro cultures of *Zea mays* L. endosperm. *In Vitro*, 1974, 9, 458-462.
7. Butcher, D.N., Sodeke, A.K., Tommerup, I.C. Factors influencing changes in ploidy and DNA levels in cells from normal, crown-gall and habituated cultures of *Helianthus annuus* L. *Protoplasma*, 1975, 86, 295-308.
8. Demoise, C.F., Partanen, C.R. Effect of subculturing and physical condition of medium on the nuclear behavior of a plant tissue culture (*Paeonia suffruticosa*). *Amer. J. Bot.*, 56, 147-152.
9. Kallak, H. Cell division and chromosome numbers in the tissue culture of *Nicotiana tabacum*. *Biol. Plant.*, 1968, 10, 199-204.
10. Kallak, H., Järvekülg, L. Changes in chromosome complement in long-term pea callus cultures. *Acta biol. Acad. Sci hung.*, 1977, 28, 183-189.
11. Kao, K.N., Miller, R.A., Gamborg, O.L., Harvey, B.L. Variations in chromosome number and structure in suspension cultures. *Can. J. Genet. Cytol.*, 1970, 12, 301.
12. Mitra, J., Maes, M.O., Steward, F.C. Growth and organized development of cultured cells. *Amer. J. Bot.*, 1960, 47, 357-368.
13. Novák, F.J. The changes of karyotype in callus cultures of *Allium sativum* L. *Caryologia*, 1974, 27, 45-54.
14. Salmia, M.A. Cytology of two *Lathyrus* tissues grown in vitro. *Annal. Bot. Fennici*, 1974, 11, 279-284.
15. Sunderland, N. Nuclear cytology. In: *Plant Tissue and Cell Culture*. Oxford e.a., 1973, 161-190.
16. Yamane, Y. Chromosome variation in calluses induced in *Vicia faba* and *Allium cepa*. *Jap. J. Genet.*, 1975, 50, 353-355.

17. Кунах В.А. Цитогенетическая разнокачественность штаммов листового и стеблевого происхождения культуры тканей *Haplorappus gracilis* (Nutt.) Gray. - Цитология и генетика, 1971, 5, 241-249
18. Murashige, T., Nakano, R. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. J. Heredity, 1966, 57, 115-118.
19. Singh, B.D. Evidence of endoreduplication in callus cultures of *Crepis suffreniana* Steud. Indian J. Exp. Biol., 1974, 12, 289-291.
20. Singh, B.D., Harvey, B.L. Cytogenetic studies on *Haplorappus gracilis* cells cultured on agar and in liquid media. Cytologia, 1975, 40, 347-354.
21. Mitra, J., Steward, F.C. Growth induction in cultures of *Haplorappus gracilis*. Amer. J. Bot., 1961, 48, 358-368.
22. Singh, B.D., Harvey, B.L., Kao, K.N., Miller, R.A. Selection pressure in cell populations of *Vicia hajatana* cultured in vitro. Can. J. Genet. Cytol., 1972, 14, 65-70.
23. Зосимович В.П., Левенко Л.А., Кркова Г.Н., Легейда В.С. Выделение штаммов *Crepis capillaris* различной пloidности в культуре ткани. Докл. АН СССР, 1972, 203, 1188-1189.
24. Sacristan, M.D. Clonal development in tumorous cultures of *Crepis capillaris*. Naturwissenschaften, 1975, 62, 139-140.
25. Кунах В.А. О связи между пloidностью штаммов *Crepis capillaris* и *Haplorappus gracilis* и спонтанным органо-генезом. - Цитология и генетика, 1974, 8, 303-308.
26. Reinert, J., Küster, H.-J. Diploide, chlorophyllhaltige Gewebekulturen aus Blättern von *Crepis capillaris* (L.) Wallr. Z. Pflanzenphysiol., 1966, 54, 213-222.
27. Sacristan, M.D. Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr. Chromosoma, 1971, 33, 273-283.

28. Зосимович В.П., Кунах В.А. Уровень, типы и происхождение абберраций хромосом в культуре изолированных растений. - Генетика, 1975, II, 37-46.
29. Кулиева Ф.Б., Шамина В.Б. Сравнительное цитогенетическое изучение культуры ткани крепис при различных условиях культивирования. - Физиология растений, 1972, 19, 372-374.
30. Сидоренко П.О., Кунах В.А. Получение культуры изолированных тканей *Parlorarrus gracilis* и *Steris capillaris* и их цитогенетическая характеристика. - Цитология и генетика, 1972, 6, 483-486.
31. Малюк В.И., Павлова М.К., Мариновская Л.В., Тимохина Н.Т., Пивень Н.М. Эффект избирательной стимуляции размножения соматических клеток определенной ploидности в гетероплоидной культуре. Докл. АН СССР, 1975, 224, 212-215.

Cytogenetic characteristic of long-term
callus culture of *Crepis capillaris*

H. Kallak, M. Vapper

S u m m a r y

A callus strain isolated from plantlets of *Crepis capillaris* and subcultured on the solid medium by Murashige and Skoog was examined cytologically. To characterize the chromosome complement dynamics of the prolonged callus strain the chromosome number and aberration frequency were determined in the 1st, 5th, 8th, 12th, 21st, 24th and 35th passages over a four and a half year period (per 200-600 metaphases plus 200-700 anaphases and telophases each time).

It was found that the initially polyploid callus tissue (cca 85 per cent of cells with $4x$ and $>4x$ chromosome complement) changed into the mixoploid one, and thereafter (starting from the 18th passage) became a karyotypically stable strain with the modal chromosome complement $2n+1$. The additional chromosome was aberrant consisting of the long shoulder of C chromosome and the long shoulder of A (or D) chromosome. Chromosome aberrations and gradual losses of aberrant chromosomes in polyploid complement were the probable origin mechanisms of the hyperdiploid karyotype. The continuous increase in the frequency of $2n+1$ cells during a long-term cultivation (from 7 per cent in the 5th passage to 73 per cent in the 21st passage) gives evidence of the selective fitness of this karyotype.

The investigated callus strain revealed a considerably low and stable rate (4-9 per cent) of aberrant anaphases and telophases during the whole period of observation.

КУЛЬТУРА РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕРБИЦИДОВ

Х.И. Каллак, Л.Я. Ярвекюльг, М.А. Ваппер

Исследованиями последних лет показано, что загрязнение среды пестицидами, удобрениями, продуктами бытовой химии, отходами промышленности и другими ядохимикатами не только оказывает на организмы непосредственное токсическое действие, но может иметь отдаленные генетические последствия как для человека, так и для всей живой природы /1-6/. Круговорот и накопление таких химикатов грозит самому ценному достоянию органической жизни на Земле - их генофонду.

Первоочередной задачей в обеспечении генетической безопасности биосферы является разработка подходящих тест-систем для испытания на мутагенность различных загрязнителей окружающей среды. Поскольку разработанные до сих пор тест-системы страдают определенными недостатками (не дают достаточной информации, не позволяют экстраполировать полученные данные на человека и т.д.), необходимо параллельное использование разных модельных систем.

С этой целью на кафедре генетики и цитологии ТГУ проведены исследования по применимости культуры растительных тканей в качестве модельной тест-системы для определения генетических последствий химикатов /7-10/. При постановке опытов мы исходили из необходимости изучить дифференциальное действие ядохимикатов, в зависимости от дозы и продолжительности действия и специфики реакции подопытных клеток и тканей. Поэтому мы не стали испытать на мутагенность возможно большее количество веществ, а постарались всесторонне изучить разные действия одного химиката. Подопытным химикатом был выбран широко применяемый гербицид 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота (2,4-Д), которая при низких дозах действует, как ауксин, стимулирующий рост и развитие растений.

Материал и методика

Объектом исследования служили разные штаммы кариотипически относительно стабильных каллусных культур, выращиваемых

в течение 3-8 лет *in vitro*. Каллус гаглопапруса (*Nardoparpus gracilis* (Nutt.) Gray) был изолирован от стеблевых сегментов и культивирован на среде Мурасиге и Скуга с содержанием 1 мг/л 2,4-Д; каллус гороха (*Pisum sativum* L.) от семян долей и культивирован на среде по Торри, содержащей в качестве ауксина 1 мг/л 2,4-Д; каллус креписа (*Strepis capillaris* L.) изолирован от проростков и культивирован на среде Мурасиге и Скуга с добавкой 1 мг/л 2,4-Д. Культуры выращивались в темноте при температуре 26-27°C.

Цитогенетические исследования проводились на давленных препаратах стандартным методом ацеторсеина.

Результаты исследований

Гербицидное действие 2,4-Д исследовалось на каллусных культурах, выращиваемых в течение нескольких лет на среде, содержащей в качестве ауксина ту же самую 2,4-Д 1 мг/л. Все подопытные штаммы имели довольно стабильные кариотипы с определенным модальным числом хромосом и частотой аберраций.

На повышение концентрации 2,4-Д в среде питания каллусные культуры реагировали замедлением роста и снижением митотической активности. При этом обнаружилось, что каллусные штаммы значительно отличаются друг от друга по резистентности в отношении гербицидного действия 2,4-Д. Дифференциальная резистентность проявляется не только у каллусных штаммов разного видового происхождения, но и у штаммов одного и того же вида.

На рисунках 1 и 2 представлены данные о воздействии 2,4-Д на митотическую активность каллусных клеток в одном штамме гаглопапруса и в одном штамме гороха. Процент митозов вычислен из 5000 прослеженных клеток для каждой точки фиксации. В подопытном каллусе гороха митозы достоверно ингибируются только при концентрации 2,4-Д 20 мг/л в среде питания, а доза 10 мг/л является еще ауксиновой. К тому же ингибирующее действие повышенных доз гербицида ограничивается первой половиной субкультуры; после месячного культивирования ингибирующий эффект 2,4-Д снимается. В каллусных клетках гаглопапруса митотическая активность достоверно падает при концентрации 2,4-Д 10 мг/л, а в некоторых штаммах даже при концентрации 5 мг/л. В исследованном штамме креписа митотиче-

ская активность заметно снижается уже при двукратном увеличении (т.е. до 2 мг/л) концентрации 2,4-Д в среде питания.

Дифференциальная резистентность каллусных культур проявляется также в их реагировании на продление периода действия 2,4-Д через несколько пассажей. Подопытный штамм А каллуса гороха можно было культивировать на среде питания с 10 мг/л 2,4-Д в течение 5 пассажей, т.е. около года. Тогда проявился кумулятивный эффект гербицидного действия 2,4-Д и каллус погиб. Каллусные штаммы гаглопашуса реагировали на продление действия 2,4-Д по-разному. Если один из подопытных штаммов гаглопашуса (В) прекратил рост и погиб уже при повторном пассировании на среде с 5 мг/л 2,4-Д (т.е. после 1,5-месячного культивирования), то другой штамм (С) продолжал рост на среде с 20 мг/л в течение 4 последующих друг за другом пассажей (т.е. 4 месяца). При повторном пассировании каллуса креписа на среде с 5 или 10 мг/л 2,4-Д культуры погибли, удалась только повторная пересадка на среду с 2 мг/л 2,4-Д. После 5 пассажей (месяцев) культивирования на среде с 2 мг/л 2,4-Д часть каллусной ткани креписа снова была переведена на среду с 5 мг/л 2,4-Д и растет на этой среде уже полтора года.

Для выявления мутагенного эффекта гербицидных доз 2,4-Д исследовали число и строение хромосом, а также частоту аберративных ана- и телофаз в подопытных каллусных штаммах. На рисунках 3-5 показаны результаты исследования воздействия повышенных доз 2,4-Д на число хромосом в некоторых каллусных штаммах гаглопашуса, гороха и креписа. Для каждой точки фиксации проанализировано 400-1000 метафаз. Доверительные границы вычислены по методу χ^2 с уровнем значимости 0,05.

Кариологический анализ подопытного каллусного штамма А гороха в 13-ом, 25-ом и 29-ом пассажах показал явную тенденцию от диплоидии ($2n = 14$) к триплоидии (рис. 3, контрольный вариант с 1 мг/л 2,4-Д). Однократное (т.е. в течение одного пассажа) повышение дозы 2,4-Д в среде питания до 20 мг/л (A^{13} и A^{25}) не вызвало значительных сдвигов в соотношении разноплоидных клеток у этого штамма: во всех подопытных вариантах обоих пассажей преобладали клетки с модалным числом хромосом, характерным для контрольного варианта этого пассажа. Так, в 13-ом пассаже преобладали диплоидные и близкие к ним анеуплоидные клетки, а в 25-ом пассаже преобладали триплоидные и близкие к ним анеуплоидные клетки. Только в конце

субкультуры 25-го пассажа под воздействием повышенных доз 2,4-Д произошло достоверное изменение в степени плоидности этого штамма: при 10 мг/л процент триплоидных клеток увеличивался от 35 в начале субкультуры до 86 в конце субкультуры, при 20 мг/л соответствующие цифры были 54 и 87. В средних данных, полученных в результате 5 фиксаций в течение субкультуры и представленных на рисунке 3, данное изменение не проявляется.

Более продолжительное действие 2,4-Д на каллусные клетки гороха привело к достоверным изменениям в соотношении разноплоидных клеток и подопытного штамма А. Об этом свидетельствуют данные, полученные при кариологическом анализе штамма А после культивирования на среде с 2 и 10 мг/л 2,4-Д в течение 5 следующих друг за другом пассажей (рис. 3, А²⁹). Под воздействием повышенных доз 2,4-Д достоверно увеличивалось количество диплоидных клеток и уменьшалось количество триплоидных клеток. Изменение соотношения диплоидных и триплоидных (и соответственно близких к ним анеуплоидных) клеток более заметно при продолжительном воздействии 2,4-Д в концентрации 2 мг/л.

Результаты приблизительного учета хромосом в подопытных штаммах А и С гаилопапруса показаны на рисунке 4. Представлены данные о воздействии 2,4-Д на соотношение разноплоидных клеток в течение одного пассажа (А¹⁵ и С⁴⁹) и в течение 4 пассажей (С⁵²). Эти данные свидетельствуют о специфике реагирования разных каллусных штаммов одного вида на повышение дозы 2,4-Д в среде питания. Миксоплоидный каллусный штамм А с модальным числом хромосом 16-20 ($2n = 4$) реагировал на увеличение концентрации 2,4-Д до 10 мг/л увеличением количества клеток с 4-15 хромосомами и уменьшением количества клеток с более чем 16 хромосомами. Зато в штамме С с модальным числом хромосом 12-15 никаких значительных изменений в соотношении разноплоидных клеток не произошло. Наряду со спецификой реагирования разных каллусных штаммов проявляется дифференциальное цитогенетическое воздействие гербицида в зависимости от продолжительности действия. Если действие повышенных доз 2,4-Д в течение одного пассажа (месяца) не вызывает значимых изменений в числе хромосом каллусных клеток (С⁴⁹), то при продолжительном культивировании этого же штамма на среде с повышенным содержанием 2,4-Д обнаруживаются соответствующие изменения (С⁵²).

Подопытный каллусный штамм креписа ($2n = 6$) характеризуется анеуплоидным модалным числом хромосом 7. Седьмая хромосома, по-видимому, произошла от реципрокной транслокации и состоит из длинного плеча хромосомы С и длинного плеча хромосомы А или Д. Результаты кариологического анализа воздействия 2,4-Д на каллус креписа показаны на рисунке 5. Из них видно, что однократное (в течение одного месяца) увеличение дозы 2,4-Д в среде питания вызывает некоторые изменения в соотношении разноплоидных клеток. Так, под воздействием 2 мг/л 2,4-Д несколько увеличивается число метафаз с 7 хромосомами и уменьшается число метафаз с набором хромосом 12 и > 12. Однако однократное увеличение дозы 2,4-Д до 10 мг/л ведет к увеличению количества диплоидных и также тетраплоидных и более чем тетраплоидных метафаз за счет уменьшения количества метафаз с 7 хромосомами. Другими словами, увеличивается кариотипическая гетерогенность каллусных клеток. Продолжительное культивирование подопытного штамма на среде с 2 или 5 мг/л 2,4-Д восстанавливает определенное соотношение разноплоидных клеток. Хромосомный анализ подопытного каллусного штамма после 12-месячного культивирования на среде с повышенным содержанием гербицида свидетельствует о постоянстве модалного числа хромосом, характерного для этого штамма. Во всех вариантах преобладают снова анеуплоидные метафазы с 7 хромосомами.

Для выявления воздействия 2,4-Д на частоту хромосомных аберраций нами определено количество аберративных ана- и телофаз с мостиками и/или фрагментами. На рисунке 6 представлены данные, полученные при исследовании трех каллусных культур разного видового происхождения и заметно отличающихся друг от друга по исходной частоте аберративных ана- и телофаз. Если в каллусе гаглопаппуса (штамм С) процент аберративных ана- и телофаз достиг 30, то в каллусе гороха соответствующее число было около 10 и в каллусе креписа всего 5-7. Процент аберративных фаз был вычислен из 400-800 проанализированных ана- и телофаз для каждой точки фиксации.

При однократном повышении (в течение одного пассажа) дозы 2,4-Д до 10 мг/л количество аберративных ана- и телофаз достоверно увеличилось в подопытном штамме гороха, но осталось без изменений в каллусных штаммах гаглопаппуса и креписа. Продление периода гербицидного действия 2,4-Д не отражалось на частоте аберративных ана- и телофаз этих каллусных

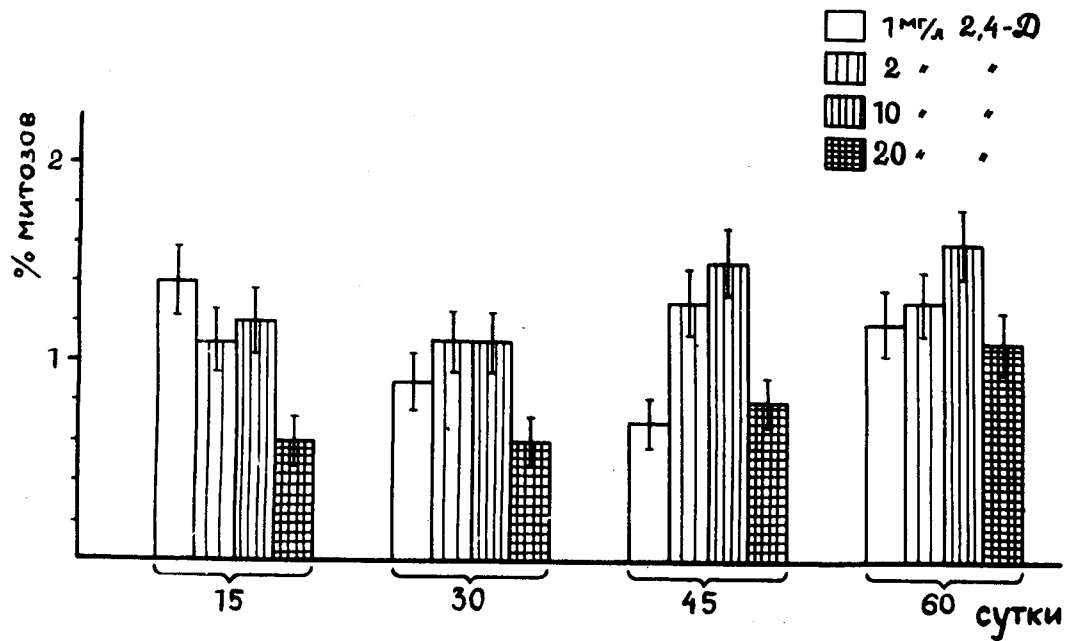


Рис. 1. Действие 2,4-Д на митотическую активность (% митозов) каллусных клеток гороха.

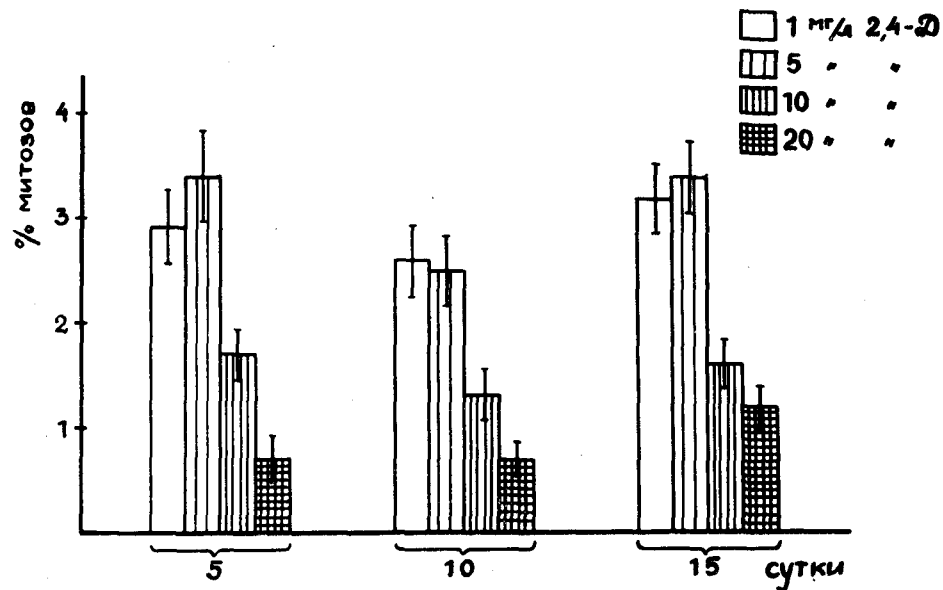


Рис. 2. Действие 2,4-Д на митотическую активность (% митозов) каллусных клеток гаплопапуса.

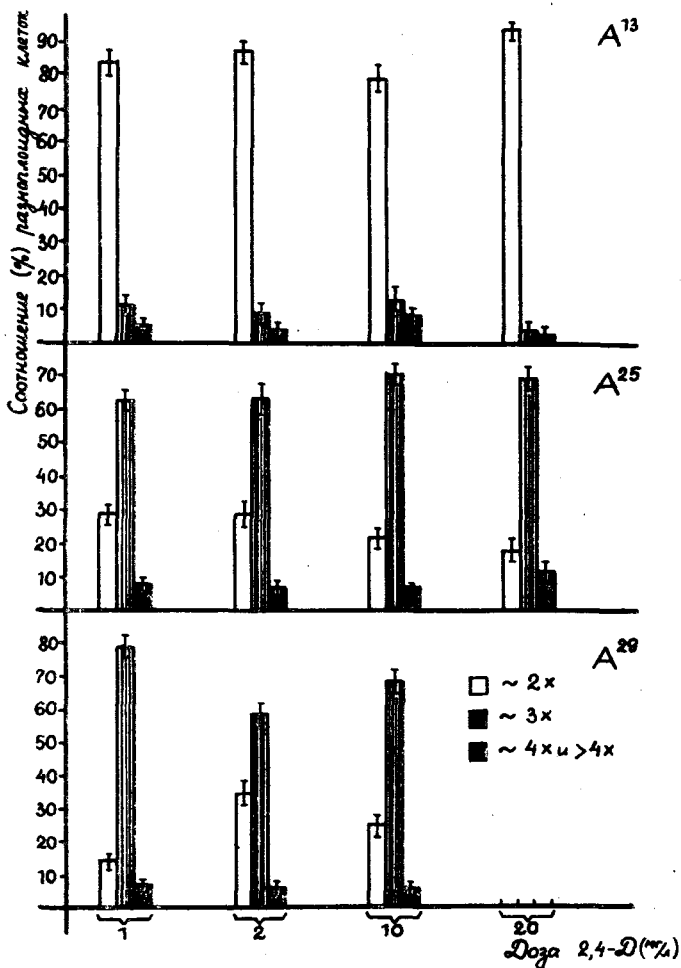


Рис. 3. Действие 2,4-Д на степень плодности калусных клеток гороха при однократном (A¹³ и A²⁵) и продолжительном воздействиях (A²⁹).

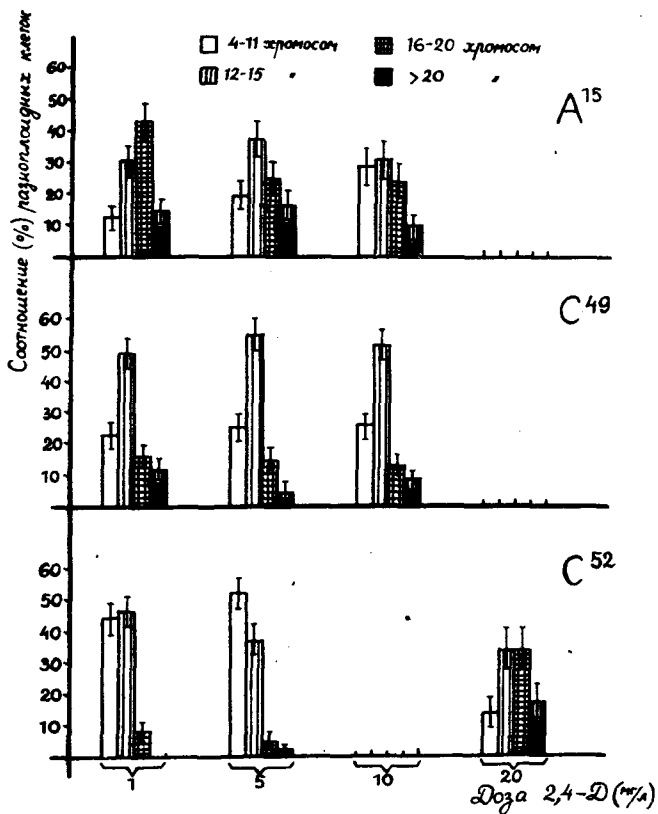


Рис. 4. Действие 2,4-Д на число хромосом каллусных клеток гаглопашуса при однократном (A¹⁵ и C⁴⁹) и продолжительном воздействиях (C⁵²).

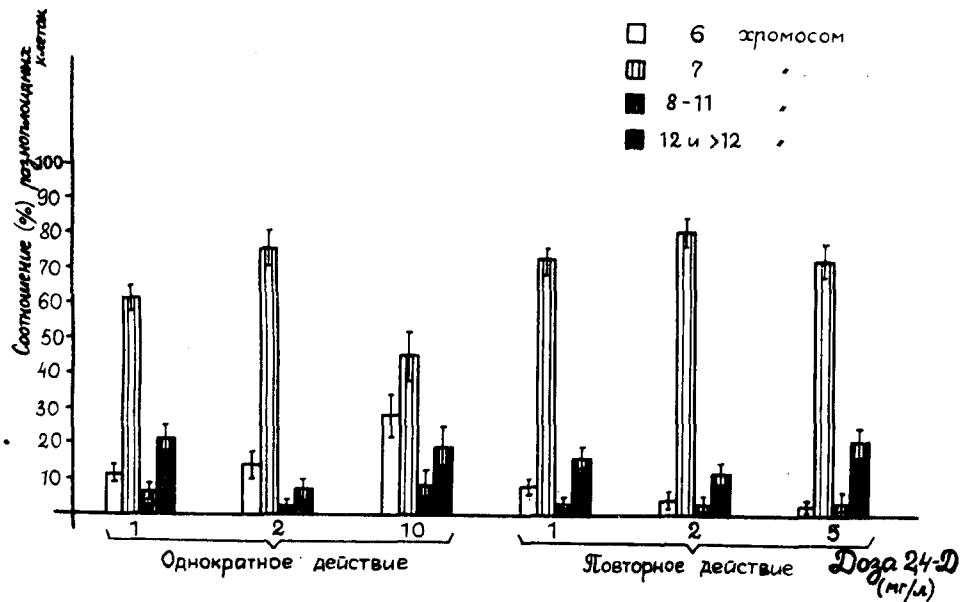


Рис. 5. Действие 2,4-Д на число хромосом каллусных клеток креписа.

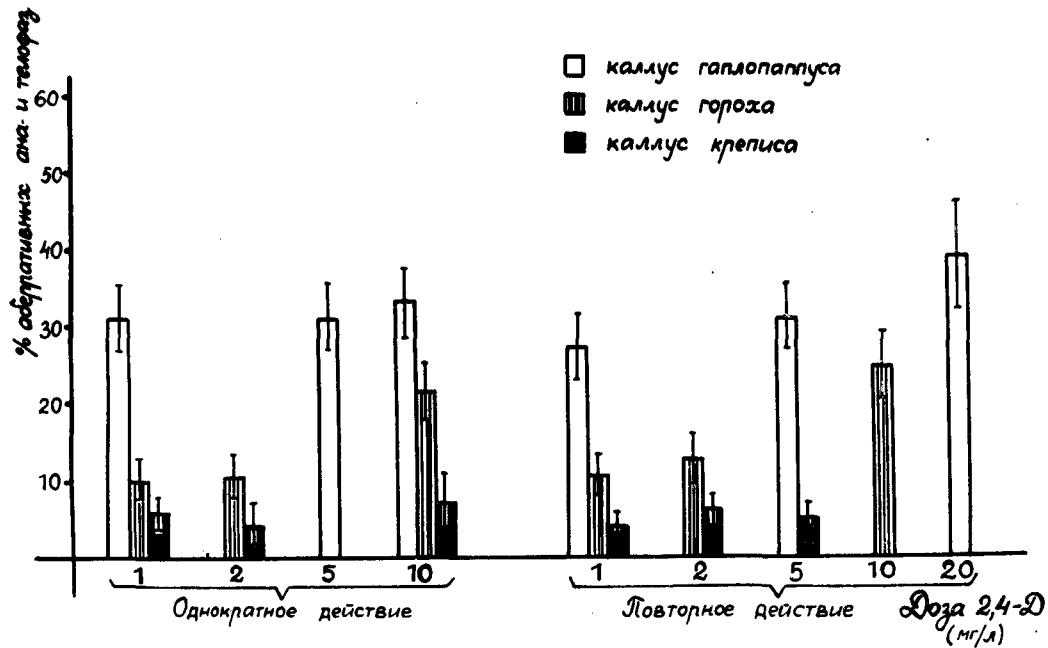


Рис. 6. Действие 2,4-Д на частоту aberrативных ана- и телофаз в каллусных клетках гаглопалпуса, гороха и креписа.

культур. После 4-месячного культивирования (в течение 4 пассажей) каллуса гаглопапруса частота аберративных ана- и телофаз значительно выше контрольного варианта только на среде с 20 мг/л 2,4-Д. 7-месячное культивирование (через 7 пассажей) каллуса креписа на среде с 5 мг/л 2,4-Д и 12-месячное культивирование (через 12 пассажей) на среде с 2 мг/л 2,4-Д не вызывало никаких изменений в частоте аберративных ана- и телофаз у этого штамма. Выращивание каллуса гороха в течение года (через 5 пассажей) на среде с 2 или 10 мг/л 2,4-Д показало такой же дозовый эффект, как при воздействии этими дозами в течение одного пассажа. Следовательно, на повышение дозы 2,4-Д (до 10 мг/л) испытанные каллусные культуры гаглопапруса и креписа не реагируют изменением частоты аберративных ана- и телофаз, ни при однократном, ни при повторном воздействии. В каллусном штамме гороха проявляется эффект дозы, но отсутствует эффект продолжительного действия.

Обсуждение

Проведенные исследования подтверждают результаты наших предыдущих испытаний о приемлемости культур растительных тканей в качестве тест-системы для изучения генетических последствий загрязнения среды. Преимущество культуры ткани как модельной системы особенно проявляется при изучении дифференциального воздействия потенциальных мутагенов. Открывается возможность изучить длительное воздействие разных доз химикатов, аналогичное длительному воздействию химикатов, накаплиющихся в биосфере в результате производственной деятельности человека. К тому же культуры ткани позволяют подробнее исследовать специфику реагирования полупытных систем, становящейся одной из важнейших задач в определении действительного риска потенциально мутагенных веществ. Кариотипически, метаболически и морфологически стабилизированные каллусные культуры являются относительно простыми и гомогенными биосистемами, выращиваемыми в постоянных регулируемых условиях. Разумеется, эти особенности культур тканей настораживают при экстраполяции полученных данных на интактные организмы. Но, с другой стороны, именно эти особенности изолированных тканей и клеток облегчают изучение настолько сложного явления, как специфика реагирования организмов. На

культурах тканей с успехом можно моделировать и анализировать вероятные (предполагаемые) корреляции между эффектами воздействия биологически активных веществ и определенными свойствами испытываемых биосистем.

Представленные в этой работе данные позволяют обсудить следующие корреляции: токсичность и интенсивность роста, мутагенность и степень плоидности, мутагенность и частота хромосомных аберраций, чувствительность в отношении токсического воздействия химикатов.

Некоторыми исследователями высказана мысль о коррелятивной связи между интенсивностью роста и резистентностью растений в отношении токсического воздействия гормональных гербицидов: чем интенсивнее рост, тем меньше резистентность /11, 12/. Наши исследования показывают, что в большинстве случаев резистентность в отношении токсического воздействия 2,4-Д действительно связывается с темпом роста подопытных культур тканей, но между этими показателями нет строгой корреляции. Так, каллус гороха, отличающийся медленным темпом роста (пересадки через 2-3 месяца), значительно более резистентен в отношении токсического воздействия 2,4-Д, чем подопытный каллусный штамм А гаглопаппуса, имеющий митотическую активность в два раза выше и относительно интенсивный рост. Однако нашими предыдущими исследованиями показано, что отдельные штаммы гаглопаппуса, имеющие сходный темп роста, но отличающиеся друг от друга по некоторым кариотипическим показателям, могут значительно различаться по своей резистентности к 2,4-Д /7/.

Литературные данные о дифференциальном мутагенном эффекте факторов среды на разные виды в основном ограничиваются представлением списков химикатов, испытанных на мутагенность в отношении одних или тех организмов. Аналогичные списки представлены относительно мутагенного действия 2,4-Д /13-15/. Имеются и некоторые работы о мутагенном действии 2,4-Д на культуры растительных тканей и клеток, свидетельствующие о видовой специфике реакции, а также о дозовом эффекте /16-19/. Однако нет данных, дающих удовлетворительное объяснение дифференциальному воздействию 2,4-Д на разные организмы или в разных условиях испытания.

Наши исследования показывают, что не только каллусные культуры разного видового происхождения, но и каллусные штаммы одного вида по-разному реагируют на повышение доз и

продление периода действия 2,4-Д. Если в одних культурах (штамм А гороха, штамм С гаглопапруса) однократное повышение дозы 2,4-Д в среде питания не вызывает никаких достоверных изменений в модальном числе хромосом их клеток и только длительное культивирование этих штаммов на среде с повышенным содержанием 2,4-Д ведет к некоторым изменениям степени плоидности, то в других культурах (штамм А гаглопапруса, подопытный штамм креписа) соотношение разноплоидных клеток изменяется уже в первом подопытном пассаже. В каллусных клетках креписа продление периода действия 2,4-Д восстанавливает исходное модальное число хромосом. Сопоставление реакций подопытных каллусных культур по изменчивости числа хромосом показывает, что она не определяется одной видовой спецификой, ибо каллусные штаммы гаглопапруса по-разному реагируют на повышение дозы 2,4-Д. Подопытные каллусные штаммы гаглопапруса отличаются друг от друга по модальному числу хромосом. Однако цитогенетическая характеристика поведения штамма А гороха в 13-ом и 25-ом пассажах свидетельствует об отсутствии корреляции между исходным уровнем плоидности и степенью гетероплоидии при повышении дозы 2,4-Д.

Дифференциальная цитогенетическая реакция испытанных каллусных штаммов на действие 2,4-Д проявляется и в частоте аберративных ана- и телофаз. Если в каллусных штаммах гаглопапруса и креписа количество аберративных ана- и телофаз практически не изменяется (ни при повышении дозы, ни при продлении периода действия 2,4-Д), то в каллусе гороха частота аберративных ана- и телофаз повышается пропорционально увеличению дозы химиката в среде питания. Аналогичная дифференциальная реакция проявляется также при воздействии 2,4-Д на зародышевые корешки этих видов. Так, при увеличении дозы 2,4-Д до 50 мг/л повышается частота аберративных ана- и телофаз в корешках креписа всего до 10%, а в корешках гороха - до 30% (данные в печати). Следовательно, дифференциальная "чувствительность" испытанных каллусных культур, проявляющаяся в частоте аберративных ана- и телофаз, выявляет видовую специфику.

Сравнение результатов, полученных при определении действия 2,4-Д на число хромосом и частоту аберративных ана- и телофаз в разных каллусных культурах показывает, что между этими цитогенетическими показателями нет определенной корреляции. Если одни культуры (например, каллус гороха) реагиру-

ют на увеличение дозы 2,4-Д повышением частоты аберративных ана- и телофаз, не проявляя значимых изменений в степени плоидности, то другие культуры (например, каллус креписа), наоборот, реагируют изменениями в числе хромосом, без соответствующих изменений в частоте аберративных ана- и телофаз. Отсюда следует необходимость применять в испытаниях на мутагенность разные методы учета, ибо тест-системы, дающие отрицательный результат в отношении частоты аберраций, могут реагировать в виде гетероплоидии, и наоборот.

Реакция подопытных каллусных культур на действие разных доз 2,4-Д свидетельствует о некоторой корреляции между резистентностью этих культур в отношении токсического действия гербицида и их кариотипической изменчивостью. Оказывается, что в резистентной к токсическому действию 2,4-Д культуре (в каллусе гороха) однократное увеличение дозы этого химиката не вызывает достоверных изменений в модалном числе хромосом. Зато чувствительный в отношении токсического действия 2,4-Д каллус креписа реагирует на увеличение дозы гербицида соответствующими изменениями в числе хромосом. С другой стороны, резистентность в отношении токсического действия 2,4-Д коррелируется с повышенной частотой аберративных ана- и телофаз и, наоборот.

Выводы

1. В культурах растительных тканей можно моделировать дифференциальное действие гормонального гербицида 2,4-Д в зависимости от дозы и продолжительности действия, а также от специфики подопытных культур.

2. Обнаружена корреляция между токсичностью 2,4-Д и интенсивностью роста подопытных культур: культуры с более интенсивным ростом чувствительнее в отношении токсического действия 2,4-Д.

3. Дифференциальная резистентность отдельных культур в отношении токсического действия 2,4-Д связывается с дифференциальной кариотипической изменчивостью этих культур: с повышением резистентности сопровождается постоянство модалного числа хромосом и повышение частоты аберративных ана- и телофаз.

Л и т е р а т у р а

1. Генетические последствия загрязнения окружающей среды. Общие вопросы и методика исследования. М., "Наука", 1977.
2. Basler, A., Herbold, B. Mutagenese und Umwelteinflüsse. Hippokrates, 47, 123-141.
3. De Serres, F.J. Mutagenicity of chemical carcinogens. Mutation Research, 1976, 41, 43-50.
4. Environmental Mutagenic Hazards. Science, 1975, 187, 503-514.
5. Fräuz, J. Die gefährdung des Menschen durch Mutagene in seiner Umwelt. Z. Allgemeinmed., 1975, 51, 969-973.
6. Sobels, F.H. Some problems associated with the testing for environmental mutagens and a perspective for studies in "comparative mutagenesis". Mutation Research, 1977, 46, 245-260.
7. Каллак Х., Каареп Ю. Цитогенетическая характеристика действия 2,4-Д на каллусные ткани *Harporarpus grasilis*. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1976, 383, 32-50.
8. Каллак Х.И., Ярвекюльг Л.Я. О влиянии 2,4-Д на каллус гороха. - Генетика и селекция. Вильнюс, 1971, 152-153.
9. Каллак Х.И., Ярвекюльг Л.Я., Пальм М.А., Веппер М.А. О дифференциальном эффекте токсического и мутагенного действия гербицида 2,4-Д. Тезисы докладов III съезда ВОГиС. Л., 1977, 203.
10. Kallak, H., Yarvekylg, L. On the cytogenetic effects of 2,4-D on pea callus in culture. Acta. biol. Acad.Sci. hung., 1971, 22, 67-73.
11. Мерелинский Ю.Г. Летальное воздействие биологически активных соединений на растительную клетку. В сб.: Регуляция метаболизма растительной клетки. Киев, 1973, 184-220.
12. Чкаников Д.И., Соколов М.С. Гербицидное действие 2,4-Д и других галогидфеноксикислот. М., 1973.
13. Куряний А.И., Пилинская М.А. Исследование пестицидов как мутагенов внешней среды. Киев, "Наук.думка", 1976.

14. The Mutagenicity of Pesticides. Concepts and Evaluation. Epstein, S., Legator, M. (ed.). Cambridge, Mass., 1971.
15. Tomkins, D.J., Grant, W.F. Monitoring natural vegetation for herbicide-induced chromosomal aberrations. Mutation Research, 1976, 36, 73-84.
16. Bayliss, M.W. The effects of 2,4-D on growth and mitosis in suspension cultures of *Daucus carota*. Plant Sci. Letters, 1977, 8, 99-103.
17. Flaudi, B. Genetical differences in the sensitivity to 2,4-D herbicide. Ann. Univ. scient. Budapest Sec. biol., 1964, 7, 73-75.
18. Oswald, T.H., Smith, A.E., Phillips, D.V. Herbicide tolerance developed in cell suspension cultures of perennial white clover. Canad. J. Bot., 1977, 55, 1351-1358.
19. Singh, B.D., Harvey, B.L. Effects of different 2,4-D concentrations on the cytogenetic behaviour of plant cells cultured in vitro. Biol. Plant., 1975, 17, 167-174.

Plant tissue culture as a model for
mutagenicity testing of herbicides

H.I. Kallak, L.J. Yarvekylg, M.A. Vapper

S u m m a r y

The applicability of plant tissue cultures to modelling the cytogenetic effects of auxetic herbicide 2,4-D was under study. It was found that the toxic as well as the mutagenic effects of 2,4-D were dependent on the concentration of the chemical (1-20 mg/l), the duration of its treatment (from 8 days to 12 months) and specific characteristics of the treated callus tissues. The differential resistance of the investigated callus strains of *Crepis capillaris*, *Haplopappus gracilis*, and *Pisum sativum* correlated with their growth rate (the calluses with more intensive growth were more sensitive to the toxic influence of the herbicide and vice versa), as well as with their karyotypic variability (the callus strains with increased resistance to 2,4-D revealed a relative constancy in their modal chromosome number and an increased frequency of aberrative ana- and telophases). Differential reaction to 2,4-D treatment characterized not only the callus tissues of different species, but also the callus strains of the same species.

ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ СЕЛЕЗЕНКИ В ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ

А. Пийрсоо

В связи с актуальностью изучения заболеваний как крови, так и кроветворных органов, в последнее время интересы исследователей клеточной биологии и практических врачей обращены на возможную достоверную идентификацию кроветворных и стромальных клеток.

Исходя из общепризнанного положения, что многие клетки в культуре сохраняют свои общие биологические свойства /1, 2/, тканевые культуры уже сейчас представляют собой перспективную модель для изучения этих клеток.

Наряду с классической светооптической методикой и современной электронной микроскопией, гисто-(cito-) химическое определение синтезов разных веществ, в том числе и ферментов, дает нам во многих случаях четкие критерии для идентификации клеток, отличающихся друг от друга как по функции, так и по происхождению.

Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы была идентификация разных клеточных типов в тканевой культуре эмбриональной селезенки при использовании разных гистохимических методов.

Материал и методика

Материалом исследования служили тканевые культуры кусочковых эксплантатов эмбриональной селезенки разных животных (мышей, крыс, морских свинок, кроликов, свиней, крупного рогатого скота). Культуры на стекле исследовались в разные сроки в течение 3 недель. Проводились следующие гистохимические определения разных веществ и ферментов: кислая фосфатаза методом Гомори в модификации Гольта и методом азосочетания /3/, 5'-нуклеотидаза на фиксированном и нефиксированном материале по Бакстейну и Майзелу /4/, тиаминпирофосфатаза по Новикову и Гольдфшеру /5/, щелочная фосфатаза методом Гомори, пероксидаза на нефиксированном материале по Грэхему и

Карновскому /6/, неспецифическая эстераза с применением α -нафтилацетата /7/, полисахариды с реакцией ШИК. Аргентофильность клеток определялась на препаратах с серебрением клеточных границ и на препаратах, обработанных по методике импрегнации серебром.

Результаты

Общая характеристика тканевых культур кусочковых эксплантатов эмбриональной селезенки приведена во многих исследованиях /8-10/.

Зона роста образуется в основном от фибробластоподобных клеток и макрофагов, но во многих случаях происходит и рост эндотелиальных клеток. Кроветворение в изученных культурах продолжается в основном в двух направлениях: по линии дифференцировки макрофагов и нейтрофилов.

Несмотря на некоторые светооптически установленные видоспецифические различия, общая морфология изученных клеток та же самая, и позволяет нам суммарно изложить полученные данные.

Кислая фосфатаза

Определение кислой фосфатазы в изученных культурах позволяет четко идентифицировать высокодифференцированные макрофаги от фибробластоподобных и эндотелиальных клеток. В распластанных на стекле макрофагах кислая фосфатаза локализуется в эндоплазме в основном в зоне Гольджи диффузно или мелкими, теснорасположенными гранулами (рис. 1а). Более крупные гранулы реакционного продукта расположены в периферии эндоплазмы. В отростчатых макрофагах, располагающихся на фибробластоподобных клетках, вся цитоплазма, включая и отростки, заполнена гранулами кислородфосфатазной активности (рис. 1б). В фибробластоподобных клетках активность кислой фосфатазы гораздо ниже, гранулы реакционного продукта расположены почти равномерно по всей цитоплазме, лишь околоядерная зона-центроплазма почти лишена гранул (рис. 1в). В округлых малодифференцированных мононуклеарных фагоцитах активность выявляется в околоядерной зоне диффузно и мелкими гранулами (рис. 1г). В ходе дифференцировки происходит увеличение клетки и повышение активной кислой фосфатазы. В

клетках из ряда дифференцировки нейтрофилов активность кислой фосфатазы незначительная — фермент выявляется лишь в отдельных гранулах (рис. 1д).

В зоне макрофагов образуются симпласты путем слияния отдельных макрофагов. Увеличение количества ядер в симпласте происходит путем инкорпорации отдельных нераспластанных макрофагов. Кислофосфатазная активность в симпластах выявляется в зоне ядер, которая, по всей вероятности, соответствует зоне Гольджи в отдельных макрофагах. Остальная часть симпластов почти лишена кислой фосфатазной активности. Интересно отметить, что симпласты инкорпорируют всегда высокоактивные клетки и что названный процесс происходит в зоне цитоплазм симпластов, где активность кислой фосфатазы наибольшая (рис. 1е).

5'-нуклеотидаза

В высокодифференцированных макрофагах фермент 5'-нуклеотидаза локализуется в цитоплазматических гранулах и на клеточной поверхности (термин по Поликару /II/ и включает надмембранную зону, плазматическую мембрану и периферическую зону гиалоплазмы) (рис. 2а). В менее дифференцированных макрофагах активность фермента выявляется отрывочно на клеточной поверхности и в отдельных гранулах в цитоплазме (рис. 2б). Разные по активности клетки часто находятся в тесных контактах (рис. 2а). Клетки из линии дифференцировки нейтрофилов не обладают 5'-нуклеотидазной активностью.

Активность фибробластоподобных клеток незначительная, но в зоне фибробластоподобных клеток расположены и высокоактивные отростчатые клетки, идентичность которых с клетками с активностью кислой фосфатазы (с макрофагами) требует дальнейшего изучения.

Тиамипирофосфатаза

В расположенных макрофагах фермент выявляется гранулярно или в виде сетки в зоне Гольджи (рис. 3а), а в высокодифференцированных округлых макрофагах реакционный продукт локализуется по всей цитоплазме (рис. 3б). Малодифференцированные макрофаги обладают незначительной активностью тиамипирофосфатазы. В ходе культивирования происходит повышение

ферментативной активности. Активность фибробластоподобных клеток незначительная.

Щелочная фосфатаза

Активность щелочной фосфатазы выявляется местами на клеточной поверхности малодифференцированных макрофагов (рис. 4а). В фибробластоподобных клетках и в высокодифференцированных макрофагах фермент обычно не выявляется, но в некоторых случаях, в более старых культурах, данный фермент локализуется и в гранулах макрофагов. Эндотелиальные клетки можно идентифицировать с помощью реакции на щелочную фосфатазу лишь в случае их роста в виде клеточного пласта (рис. 4б). В последнем случае активность фермента отмечается на клеточной поверхности. Локализация щелочной фосфатазы в предшественниках гранулоцитов в культуре требует специального изучения с учетом видовой специфичности.

Неспецифическая эстераза

Результаты полностью совпадают с данными реакции кислой фосфатазы.

Пероксидаза

Фермент пероксидазы позволяет идентифицировать предшественников макрофагов от малодифференцированных нейтрофилов. В малодифференцированных нейтрофилах фермент локализуется вокруг ядер как в виде гранул, так и диффузно (рис. 5а). Это дает возможность по структуре ядер (сами ядра не обладают активностью) дифференцировать малодифференцированные нейтрофилы от соответствующих макрофагов. Интересно отметить, что в колонии гранулоцитов особенно активными являются зоны контакта между клетками (рис. 5а, б). Среди предшественников гранулоцитов имеются клетки с кольцевидными ядрами. В этих клетках фермент пероксидазы выявляется розеткообразно в середине клетки (рис. 5б).

В предшественниках макрофагов фермент выявляется отдельными гранулами в цитоплазме многих, но не всех клеток (рис. 5в). Высокодифференцированные макрофаги обычно не обладают пероксидазной активностью, но в отдельных клетках все же можно найти гранулы с пероксидазной активностью, (рис. 5г).

Полисахариды

ШИК-положительные, диастаз-резистентные гранулы обнаруживаются гораздо чаще в макрофагах, чем в фибробластоподобных клетках. ШИК-положительный материал в основном совпадает по локализации с активностью кислой фосфатазы как в макрофагах, так и в симпластах (рис. 6). Небезынтересно отметить, что в инкорпорированных в симпласте клетках происходит быстрое уменьшение количества ШИК-положительных гранул (рис. 6).

Аргентофильность

Высокодифференцированные макрофаги являются и высокоаргентофильными клетками. Соли серебра локализованы в основном в зоне Гольджи в распластанных макрофагах или по всей поверхности округлых макрофагов (в том числе, видимо, и в менее дифференцированных формах) (рис. 7).

Фибробластоподобные и эндотелиальные клетки, а также нейтрофилы не являются аргентофильными.

Обсуждение

Наряду с классической техникой, гистохимические реакции для выявления разных ферментов и веществ позволяют более четко идентифицировать разные клеточные типы, в частности в культуре тканей.

Использованные нами гистохимические тесты позволяют в культуре эмбриональной селезенки четко различить макрофаги от фибробластоподобных и эндотелиальных клеток, малодифференцированные клетки макрофагального ряда от предшественников гранулоцитов. Идентификация эндотелиальных клеток от фибробластоподобных удавалась нам лишь в случае роста их в виде клеточного пласта с помощью реакции на щелочную фосфатазу.

Высокодифференцированные макрофаги обладают высокой активностью кислой фосфатазы, тиаминпирофосфатазы и неспецифической эстеразы. В их цитоплазме локализуется большое количество ШИК-положительного материала и эти клетки являются маркерными для идентификации высокодифференцированных макрофагов от фибробластоподобных клеток.

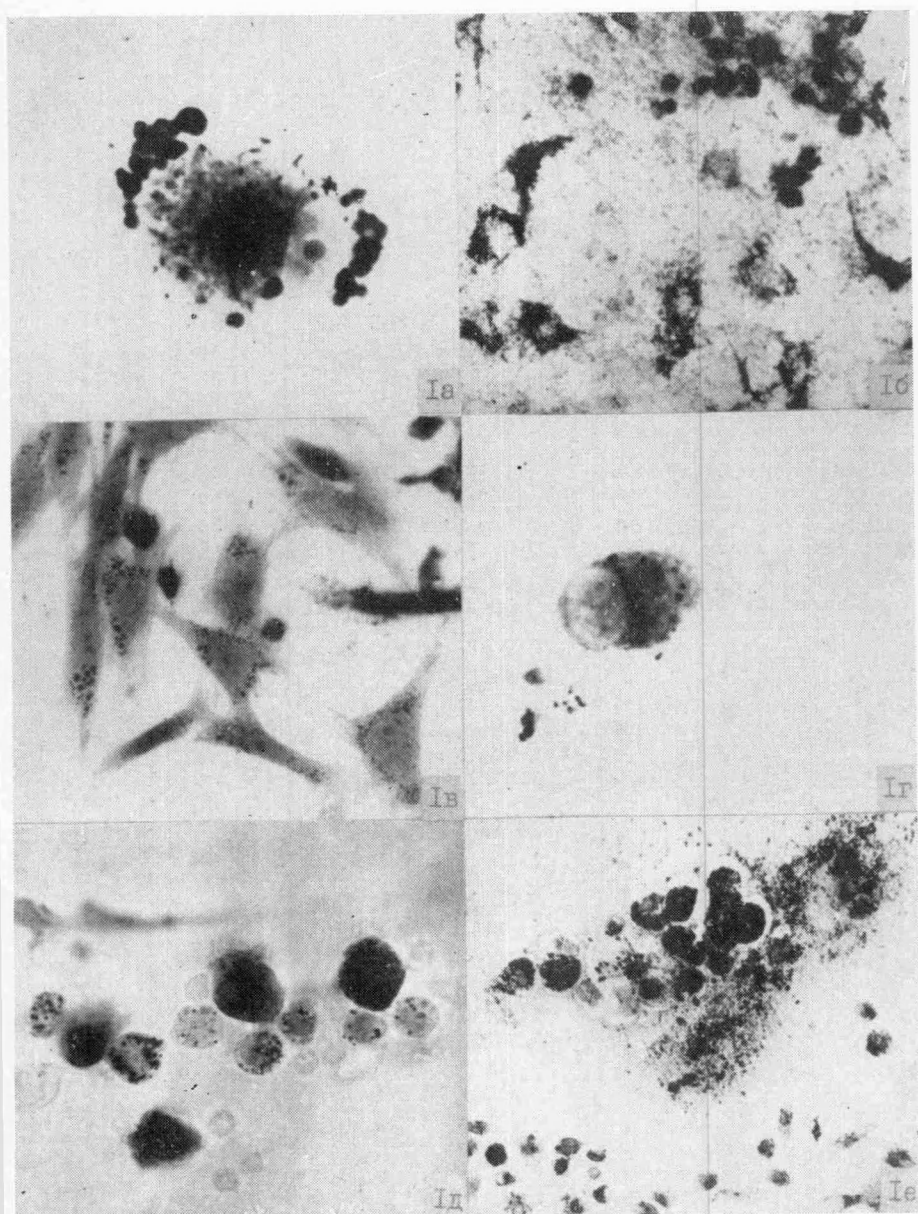


Рис. 1. Кислая фосфатаза. а) высокодифференцированный распластанный макрофаг, $\times 2050$., б) отростчатые макрофаги, $\times 460$., в) фибробласты, $\times 460$., г) малодифференцированный макрофаг, $\times 1370$., д) предшественники нейтрофилов, $\times 620$., е) симпласты, инкорпорирующие высокоактивные макрофаги, $\times 360$.

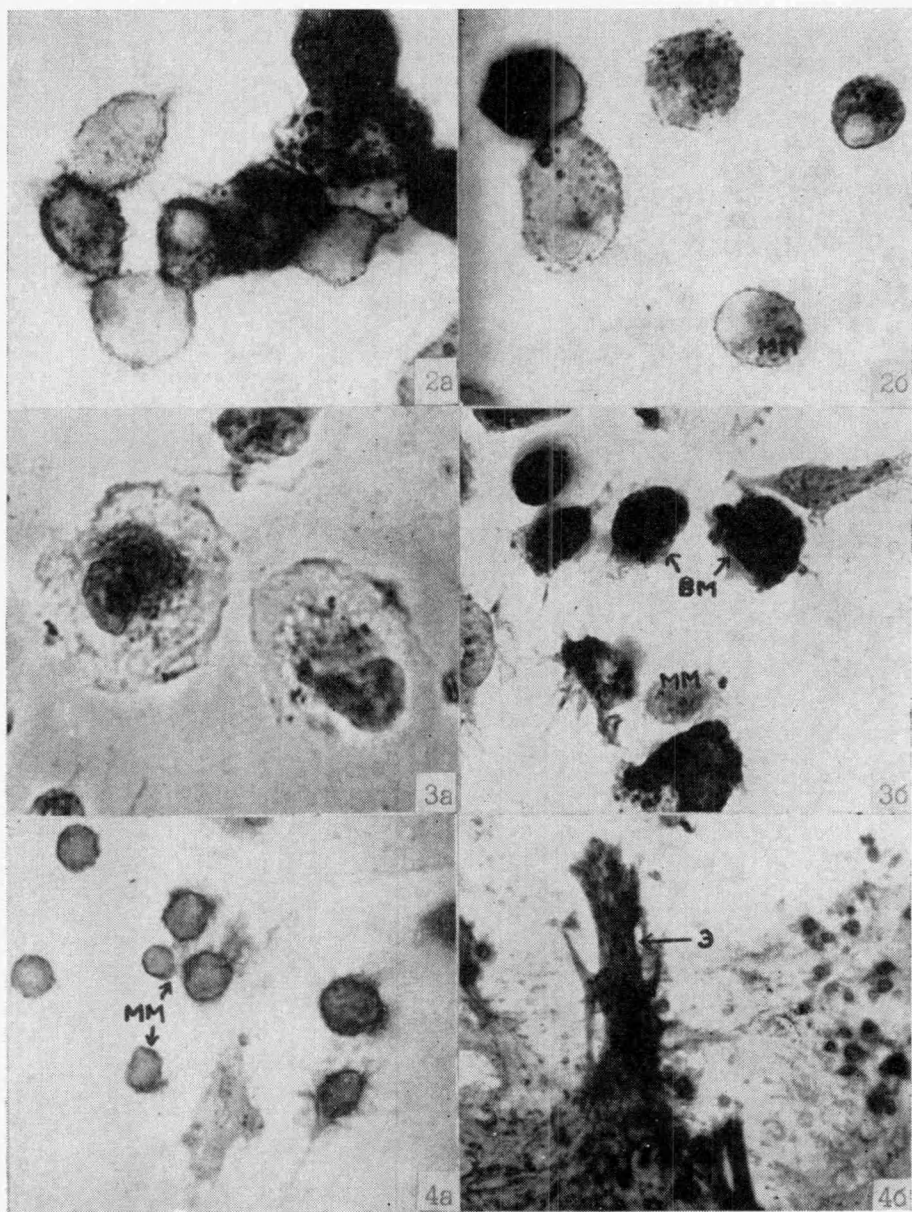


Рис. 2. 5-нуклеотидаза: а) контакты между макрофагами разной ферментативной активности, $\times 1370$, б) малодифференцированной макрофаг(мм), $\times 1370$.

Рис. 3. Тиаминпирофосфатаза: а) высокодифференцированные распластанные макрофаги, $\times 1370$, б) округлые высокодифференцированные макрофаги(вм) и малодифференцированные макрофаги(мм), $\times 1370$.

Рис. 4. Щелочная фосфатаза: а) малодифференцированные макрофаги(мм), $\times 1370$, б) клеточный пласт эндотелиальных клеток(э), $\times 360$.

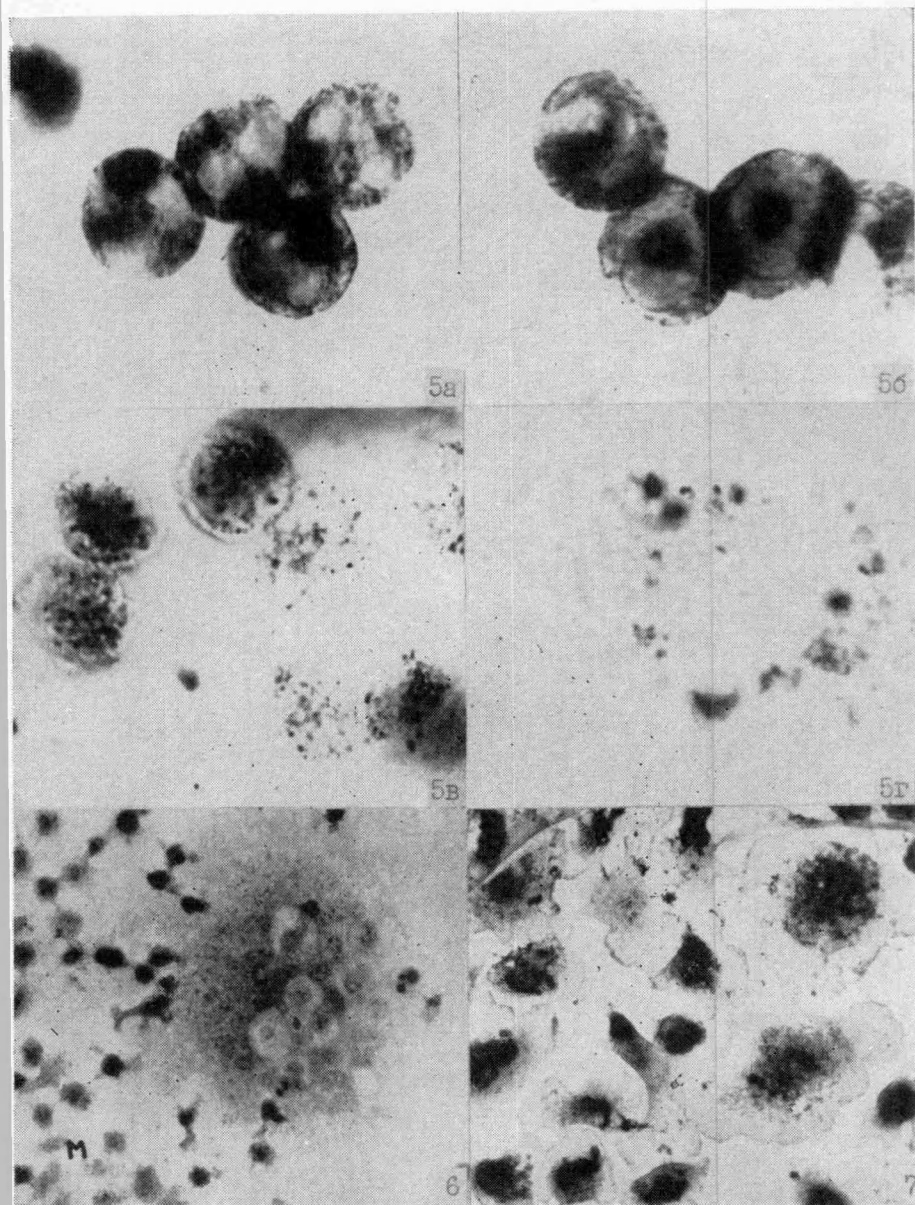


Рис. 5. Пероксидаза: а, б) предшественники нейтрофилов, $\times 2050$, в) мало-
дифференцированные макрофаги, $\times 2050$, г) высокодифференцированный
макрофаг, $\times 2050$.

Рис. 6. ШИК-положительный, диастаз — резистентный материал в макрофа-
гах(м) и в симпласте(с), $\times 460$.

Рис. 7. Аргентофильные макрофаги. $\times 1370$.

Изучение клеток макрофагального ряда показало, что в ходе дифференцировки как на *in vitro* /12, 13/, так и на *in vivo* /14/ в модели происходит повышение активности гидролитических ферментов, в частности кислой фосфатазы. Присутствие малоактивных (кислая фосфатаза) клеток в наших культурах явно свидетельствует о присутствии предшественников макрофагов в культуре не менее 2-3 недель.

5'-нуклеотидаза является, с одной стороны, маркерным ферментом цитоплазматической мембраны /15/, но, с другой стороны, отмечена и ее локализация в лизосомах.

Полученные нами данные показывают, что фермент 5'-нуклеотидазы локализуется в высокодифференцированных макрофагах как во многих цитоплазматических гранулах, так и на поверхности клеток. В малодифференцированных клетках активность фермента выявляется лишь в немногих гранулах в цитоплазме и местами на поверхности клеток. Соответствие высокоактивных отростчатых клеток в зоне роста фибробластоподобных клеток макрофагам с высокой активностью кислой фосфатазы (охарактеризованные нами) или специальным ретикулярным клеткам с высокой активностью 5'-нуклеотидазы /17, 18, 19/ требует дальнейшего изучения.

Во многих исследованиях показано, что тиаминпирофосфатаза является маркерным ферментом аппарата Гольджи /20, 21/. По литературным данным, моноциты почти не содержат данный фермент, в отличие от дифференцированных макрофагов, в которых активность фермента выявляется в зоне Гольджи /14/. Наши данные хорошо согласуются с вышесказанным, что (а также и полученные данные о других ферментах) указывает на сходство дифференцировки мононуклеарных фагоцитов в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Противоречивые данные получены в отношении локализации щелочной фосфатазы. В литературе указано на локализацию щелочной фосфатазы как на плазматической мембране /22/, так и лизосомах /23/. Охарактеризованные нами щелочно-фосфатазные клетки (активность на поверхности клеток) относятся в основном к малодифференцированным клеткам макрофагального ряда, хотя Голдстейн с соавторами /24/ отрицает наличие щелочной фосфатазы в культивированных клетках мононуклеарных фагоцитов, в том числе и в моноцитах. Интересно отметить, что в клетках из линии дифференцировки гранулоцитов Библиамс /25/ указывает на негативную корреляцию между активностью

щелочной фосфатазы и созреванием гранулоцитов. Существует ли такая зависимость и в клетках мононуклеарных фагоцитов — неизвестно.

В эндотелиальных клетках щелочная фосфатаза выявляется лишь в случае их роста в виде клеточного пласта. В отдельных эндотелиальных клетках ферментативная активность не выявляется, хотя в отдельных случаях доказана щелочная фосфатаза и в распластаных, фибробластоподобных эндотелиальных клетках /26/.

Интенсивность реакции и локализации пероксидазы являются хорошим маркером для идентификации малодифференцированных клеток мононуклеарных фагоцитов от предшественников нейтрофилов в культуре. Уменьшение пероксидазной активности в дифференцирующих клетках макрофагального ряда описано неоднократно /27, 28/. Тем не менее в литературе приводятся и данные о высокодифференцированных пероксидаз-положительных макрофагах /29, 30/, хотя при оценке специфичности реакции светооптически в высокодифференцированных клетках надо учитывать, что гранулы гемосидерина и фагоцитированные эритроциты могут дать неспецифическую для макрофагов реакцию /31/.

Аргентофильность является специфическим свойством мононуклеарных фагоцитов. Доказано, что в лимфоидной ткани аргентофильные клетки являются фагоцитами /32/. Это еще раз подтверждает, что общие свойства клеток в культуре сохраняются.

Выводы

1. Используемые нами гистохимические тесты позволяют в культуре эмбриональной селезенки различать макрофаги от фибробластоподобных и эндотелиальных клеток.

2. Дифференцированные макрофаги в культуре обладают большим количеством кислой фосфатазы, тиаминпирофосфатазы, неспецифической эстеразы, 5'-нуклеотидазы, ПИК-положительного материала и они являются сильно аргентофильными клетками.

3. 5'-нуклеотидаза локализуется в высокодифференцированных макрофагах в их цитоплазме и на поверхности клеток, в малодифференцированных клетках в немногих цитоплазматических гранулах и местах на поверхности.

4. Интенсивность реакции и локализации пероксидазы является хорошим маркером для идентификации малодифференцированных клеток макрофагов от предшественников нейтрофилов в культуре.

Л и т е р а т у р а

1. Пылдвере К.И. Проблема биологической специфичности глико-эпидимальной ткани. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1966, 189, 108-120.
2. Залкинд С.Я., Борисоглебская Н.В., Гуткина А.В. Проблема стабильности и своеобразия клеточных элементов однослойной культуры. Арх. анат., 1973, 54, 92-99.
3. Бутенко З.А., Глузмен Д.Ф., Зак К.-П., Филиатова Р.С., Шляховенко В.А. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. Киев, 1974.
4. Гайер Г. Электронная гистохимия. М., 1974.
5. Novikoff A.B., Goldfisher S. Nucleosidediphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. Proc. Nat. Acad. Sci., 1961, 47, 802-810.
6. Graham R.C., Karnovsky M.J. The nearly stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem., 1966, 14, 291-302.
7. Берстон М. Гистохимия ферментов. М., 1965.
8. Fisher M., Dolschansky L. Über das Wachstum von Milzstromazellen in vitro. Wilhelm Roux' Arch. f. Entwickl. Mech. Org., 1929, 116, 123-135.
9. Treves A.J., Feldman M., Kaplan H.S. Primary cultures of human spleen macrophages in vitro. J. Imm. Methods, 1976, 13, 279-288.
10. Пийрсоо А. Макрофаги в тканевых культурах селезенки и мягких мозговых оболочек. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1976, 383, 84-93.

- II. Поликарп А. Поверхность клетки и ее микросреда. М., 1975.
12. Cohn Z.A., Benson B. The differentiation of mononuclear phagocytes, morphology, cytochemistry and biochemistry. *J. Exp. Med.*, 1965, 121, 153-171.
 13. Cohn Z.A., Fedorko M.E., Hirsch J.G. The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. V. The formation of macrophage lysosomes. *J. Exp. Med.*, 1966, 123, 765-781.
 14. Braunsteiner H., Schmalzl F. Cytochemistry of monocytes and macrophages. In "Mononuclear phagocytes" Ed. Furth R., 1970, 62-81.
 15. Müller-Hermelink H.K. Characterization of the B-cell and T-cell regions of human lymphatic tissue through enzyme histochemical demonstration of ATP-ase and 5'-Nucleotidase activities. *Virchows Arch. B Cell Path.*, 1974, 16, 371-378.
 16. Bowers W.E. A biochemical study of lysosomes in lymphoid tissues. In "Mononuclear phagocytes" Ed. Furth R., 1970, 81-102.
 17. Catayee G., Senelar R., Kochoyan Y., Gardeux D. Polymorphisme des cellules reticulaires spleniques de quelques apres mise en evidence de quelques activities phosphatasiques lysosomales. *Bull. Ass. des Anat.*, 1973, 57, 255-262.
 18. Catayee G., Senelar R., Chalet M., Kochoyan Y. Quelques modalites des rapports histo-enzymatiques lympho-reticulaires de la pulpe blanche splenique der rat. *Bull. Ass. des Anat.*, 1974, 58, 519-526.
 19. Catayee G., Senelar R., Chalet M., Kochoyan Y. Lysosomal activities of reticular system of spleen of some rodents. *Ann. Histochem.*, 1976, 21, 301-306.
 20. Meek G.A., Brandbury S. Localization of thiamine pyrophosphatase activity in the Golgi apparatus of an mollusc *Helix aspera*. *J. Cell Biol.*, 1963, 18, 73-85.
 21. Cheetham R.D., Morré J.D., Pannek C., Friend D.S. Isolation of a Golgi apparatus-rich fraction from rat liver. IV. Thiamine pyrophosphatase. *J. Cell Biol.*, 1971, 49, 899-905.
 22. Lin C.-W., Sasaki M., Orcutt M.L., Miyavama H., Singer R.M. Plasma membrane localization of alkaline phos-

- phatase in He La cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 1976, 24, 659-667.
23. Lodja Z. Aktuelle Probleme der Cytochemie der lysosomalen Hydrolasen. *Acta morphol. Acad. sci hung.*, 1972, 20, 269-293.
 24. Goldstein M.V., Mc Cormick T. Cytochemical studies during the differentiation of normal human monocytes in vitro. *Am. J. Path.*, 1957, 33, 737-747.
 25. Williams D.M. Leucocyte alkaline phosphatase as a marker of cell maturity: a quantitative cytochemical and autoradiographic study. *Br. J. Haematol.*, 1975, 31, 371-380.
 26. Farnes P., Barker B.E. Cytochemical studies of human bone marrow fibroblast-like cells. I. Alkaline phosphatase. *Exp. Cell Res.*, 1963, 29, 278-288.
 27. Leder L.-D. Herkunft und cytogenetische Bedeutung der Monocytenperoxydase. *Klin. Wochenschr.*, 1966, 44, 854-855.
 28. Furth R., Hirsch J.G., Fedorko M. Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse promonocytes, monocytes and macrophages. *J. Exp. Med.*, 1970, 132, 794-812.
 29. Daems W.Th., Brederoo P. Electron microscopical studies on the structure, phagocytic properties and peroxidatic activity of resident and exudate peritoneal macrophages in the guinea pig. *Z. Zellforsch.*, 1973, 144, 247-297.
 30. Romeo D., Cramer R., Marzi T., Soranzo M.R., Zabucchi G., Rossi F. Peroxidase activity of alveolar and peritoneal macrophages. *J. Reticuloend. Soc.*, 1973, 13, 399-409.
 31. Steinman R.M., Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.*, 1973, 137, 1142-1162.
 32. Pettersen J.C. A comparison of the metalophilic reticuloendothelial cells containing acid phosphatase and non-specific esterase in the lymphoid nodules of normal and stimulated rats. *Anat. Rec.*, 1964, 149, 269-277.

Histochemical identification of cells in
the tissue cultures of embryonic spleen

A. Piirsoo

S u m m a r y

Several histochemical methods were applied to identify various cells in the tissue cultures of embryonic spleen. These methods included acid phosphatase, thiamine pyrophosphate, non-specific esterase, 5'-nucleotidase, PAS reactions and silver impregnation for mononuclear phagocytes (macrophages) and giant cells, alkaline phosphatase for macrophage precursor cells and also for vascular endothelium, peroxidase for precursor cells of neutrophils.

КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ СЕЛЕЗЕНКИ ЭМБРИОНОВ И НОВОРОЖДЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

А. Пийрсоо

В ходе онтогенеза животных происходит ряд изменений в функциях разных органов, в том числе и селезенки. В связи с бурным развитием клеточной иммунологии в последние десятилетия, огромное количество работ посвящено изучению морфологии и функции definitive селезенки /1,2/. Важнейшей функцией селезенки взрослого организма является защитная функция, которая, с одной стороны, связана со способностью лимфоидных клеток продуцировать антитела, а с другой стороны, — с фагоцитарной способностью стромальных клеток элиминировать инородные частицы, в том числе и микроорганизмы. Разумеется, во многих случаях обе эти стороны тесно связаны и их можно разделять лишь условно. Очень мало работ посвящено изучению эмбриональной селезенки, которая является одним из важных кроветворных органов в эмбриогенезе /3,4/. Это, с одной стороны, подчеркивает важность проведения морфологического анализа клеток эмбриональной селезенки. С другой стороны, в последние годы гистологи уделяют большое внимание изучению стромальных клеток кроветворных органов. Это обусловлено ранее полученными данными о взаимосвязи стромальных клеток с клетками из разных линий кроветворения в ходе дифференцировки последних. Кроме того, гистогенез и развитие разных стромальных клеток в онтогенезе остается непонятным во многих отношениях. Тканевые культуры селезенки эмбрионов перинатального возраста и новорожденных животных являются хорошей моделью для изучения стромальных клеток и их взаимосвязей с кроветворными элементами. Все это еще раз подчеркивает важность изучения интактной селезенки эмбрионов и новорожденных животных.

Материал и методика

Изучались селезенки эмбрионов мышей (3 животных) и кроликов (2 животных) перинатального возраста и новорожденных животных (4 мыши и 2 кролика). Для сравнительной оценки исследовались и селезенки эмбриона мыши 15-дневного возраста и селезенки 3-месячной мыши. Пользовались светомикроскопической техникой методом полутонких срезов и электронномикроскопическим исследованием ультратонких срезов. Материал фиксировался в 2,5%-ном растворе глутаральдегида и в 1%-ном растворе четырехоксида осмия, забуференном какодилатом натрия, и заливался в эпон-812. Полутонкие эпоксидные срезы окрашивались полихромно метиленовым синим и фуксином по методу Хамфри и Питмана /5/, ультратонкие срезы — ацетатом уранила и цитратом. При помощи ^3H -тимидина провели автордиографический анализ синтеза ДНК (материал фиксировался после 1-часовой инъекции ^3H -тимидина в количестве 2 мкКи на 1 г веса). Использовалась фотоэмульсия типа М.

Результаты

С в е т о м и к р о с к о п и ч е с к о е и с с л е - д о в а н и е

Структура селезенки эмбрионов перинатального возраста и новорожденных животных является окончательно не сформированной. Селезенка покрыта тонкой капсулой, из которой выходят трабекулы, разделяющие селезеночную ткань на условные сегменты. По развитию трабекулы далеко отстают от названных структур селезенки взрослого организма. Как капсула, так и трабекулы состоят из фибробластов, окруженных коллагеновыми волокнами. В зависимости от вида животных и возраста эмбрионов, в развитии белой пульпы имеется некоторое различие. Хотя мы не ставили задачей изучение гистологической структуры селезенки, а лишь характеристику клеточного состава, тем не менее можно сделать и некоторые общие замечания в отношении развития белой пульпы. В ходе эмбрионального развития проис-

ходит увеличение соотношения белой и красной пульпы. Если в изученных эмбрионах наиболее раннего срока отмечались лишь малые скопления лимфоидных клеток вокруг артериальных сосудов, то в более позднем возрасте во многих случаях имеются уже обширные участки лимфоидных клеток, хотя даже у новорожденных животных не наблюдается окончательного формирования структур лимфоидных фолликулов. У новорожденных кроликов соотношение белой и красной пульпы гораздо выше, чем у мышей.

Характерными структурами селезенки изученного возраста являются специфические кровеносные сосуды малого размера, соответственно венозные синусы и венулы в красной и артериолы в белой пульпе (рис. 1б, в). Венозные синусы и венулы выстланы плоскими эндотелиальными клетками, расположенными в один слой. Артериолы на фиксированном материале полностью закрыты. Высокие эндотелиальные клетки артериол заслоняют их просвет. Под эндотелиальными клетками находится сплошная фуксинофильная базальная мембрана. Слой эндотелиальных клеток с базальной мембраной окружен одно- и двухслойно концентрически расположенными базофильными клетками, между которыми находятся фуксинофильные волокна (рис. 1). Часто и на некотором расстоянии от артериол обнаруживается более развитая сетка фуксинофильного материала, которая связана со стромальными клетками. Большие кровеносные сосуды эмбриональной селезенки не отличаются от соответствующих сосудов других органов и тканей.

Светомикроскопически можно установить, что в красной пульпе селезенки происходит интенсивный эритропоэз, на что указывает наличие большого количества предшественников эритроидного ряда дифференцировки (рис. 1а). В селезенке кроликов эритропоэз выражен менее интенсивно, чем в селезенке мышей того же возраста.

Наряду с эритропоэзом в эмбриональной селезенке происходит также мегакариоцитогенез и менее интенсивно — гранулопоэз. Об этом свидетельствует наличие клеток предшественников (рис. 1а).

От идентифицированных клеток из линии дифференцировки как эритроцитов, так и гранулоцитов резко отличаются большие

округлые клетки (12 мкм) со светлыми большими ядрами, которые по всем критериям соответствуют гемопитобласту (рис. 1а, в). В белой пульпе основными клетками являются лимфоциты. Между лимфоцитами расположены стромальные клетки. В белой пульпе лимфоидные клетки тесно соприкасаются друг с другом и со стромальными клетками (рис. 1б).

В обеих зонах как между кроветворными, так и лимфоидными клетками расположены стромальные клетки разного типа. Светомикроскопически их идентификация во многих случаях затруднена. Достоверно можно различить лишь два типа стромальных клеток: базофильные, интенсивно окрашенные (темные) стромальные клетки и светлые стромальные клетки (рис. 1в). Иногда среди светлых стромальных клеток можно различить и макрофаги, в цитоплазме которых находятся гранулы разного размера. Если темные стромальные клетки всегда связаны с фуксинофильными волокнами, то в соседстве светлых стромальных клеток фуксинофильный материал встречается реже. Светомикроскопически идентификация эндотелиальных клеток синусов от остальных стромальных клеток затруднена. Общее количество стромальных клеток в красной пульпе выше, чем в белой.

Данные авторадииографического изучения селезенки односуточных мышей показывают, что активно синтезирующие ДНК клетки относятся не только к кроветворным, но и к стромальным клеткам. Включение изотопа в лимфоидных клетках небольшое.

Э л е к т р о н н о м и к р о с к о п и ч е с к о е и с с л е д о в а н и е

Электронномикроскопический анализ позволяет по ультраструктурным признакам более четко идентифицировать разные клеточные типы из кроветворных и стромальных клеток.

I Кроветворные клетки

I. Клетки эритроидного ряда

В эмбриональной селезенке представлены клетки во всех

стадиях эритроцитопоэза: проэритробласты, эритробласты, нормобласты и эритроциты (рис. 2). Эритробласты являются интенсивно пролиферирующими клетками. Об этом свидетельствует часто встречающиеся митозы. В ходе дифференцировки эритроидных клеток происходят следующие морфологические изменения: уменьшаются размеры клеток и их ядер, увеличивается гетерохроматизация (соотношение электронноплотного и светлого региона в ядре увеличивается) и округление клеток. В регионах эритропоэза часто встречаются и стромальные клетки, часть которых по ультраструктурным признакам можно отнести к макрофагальным элементам (рис. 2).

2. Клетки из линии дифференцировки гранулоцитов

Наиболее часто из клеток гранулопоэза встречаются зрелые нейтрофильные гранулоциты и в меньшем количестве — их предшественники. Высокодифференцированные нейтрофилы характеризуются сегментированным ядром и электронноплотной цитоплазмой.

Миелобласты (рис. 3) имеют овальное ядро, в котором хроматин сконцентрирован около ядерной оболочки. Цитоплазма заполнена рибосомами и полисомами, имеются единичные митохондрии и вблизи плазматической мембраны сконцентрированы первичные электронноплотные гранулы размерами от 0,05 мкм до 0,2 мкм.

В ходе дальнейшей дифференцировки происходит изменение структуры ядра и цитоплазмы. Ядра приобретают более сегментированный вид, количество гетерохроматина возле ядерной оболочки увеличивается. В цитоплазме во много раз увеличивается количество канальцев гранулярной цитоплазматической сети и митохондрий. В развитом комплексе Гольджи происходит образование электронноплотных первичных гранул нейтрофилов.

Кроме клеток нейтрофильного ряда дифференцировки, встречаются и базофильные гранулоциты с большими (0,5 мкм) электронноплотными гранулами в цитоплазме (рис. 4). Необходимо отметить, что клетки в разных стадиях гранулопоэза обычно тесно контактируют.

Что касается ранее описанных клеток с чертами гемоцитобласта, то и на основании электронномикроскопического анализа можно сказать, что они относятся к недифференцированным клеткам и имеют крупное светлое ядро с одним ядрышком (рис. 5). Цитоплазма заполнена рибосомами, имеются и единичные митохондрии и каналцы цитоплазматической сети, реже виден выраженный аппарат Гольджи.

3. Линия дифференцировки мегакариоцитов

Характерными и наиболее часто встречающимися клетками из линии дифференцировки мегакариоцитов в эмбриональной селезенке являются промегакариобласты и мегакариоциты (рис. 6а). Это крупные клетки диаметром до 100 мкм. В мегакариобластах ядра имеют форму незакрытого кольца. В центре клетки располагается аппарат Гольджи, который состоит из расширенных цистерн и вакуолей. В зоне аппарата Гольджи отмечаются малые гранулы с электронноплотной сердцевинной. В остальной части цитоплазмы находятся большие, иногда расширенные каналцы гранулярной цитоплазматической сети и большое количество рибосом. Мегакариоциты имеют большие сегментированные ядра неправильной формы. Цитоплазма богата рибосомами, количество каналцев гранулярной цитоплазматической сети уменьшено. Характерным признаком средней зоны цитоплазмы мегакариоцита является сильно развитая система трубочек (рис. 6б), разделяющая цитоплазму на условные фрагменты, территории которых соответствуют будущим тромбоцитам. В этой зоне располагается и большое количество электронноплотных гранул (0,05 мкм) и светлых вакуолей, но зона почти лишена рибосом.

4. Клетки лимфоидного ряда

Лимфоциты находятся в тесных контактах как между собой (рис. 7а), так и со стромальными элементами (рис. 7б), расположенными в зоне белой пульпы. Чаще встречаются малые лимфоциты, но отмечаются также и клетки большего размера.

II Стромальные клетки

I. Эндотелий

Электронномикроскопически можно идентифицировать две категории эндотелиальных клеток: эндотелиальные клетки венозных синусов и венул и эндотелиальные клетки артериол.

Эндотелиальные клетки венозных сосудов и синусов располагаются в один слой. Соседние клетки связаны друг с другом десмосомами или отростками, между которыми образуются тесные контакты на более широких расстояниях (рис. 8а). Образуются контакты типа запирающей зоны. В светлой цитоплазме находится большое количество свободных рибосом, много микропузырьков, в том числе и окаймленных, и митохондрии со светлым матриксом. Иногда вышеназванные эндотелиальные клетки имеют цитоплазматические выросты в просвете сосудов.

Высокие эндотелиальные клетки выстилают артериолы. Их характеризует большое светлое ядро обычно с одним большим ядрышком (рис. 8б). Важным признаком эндотелиальных клеток артериол является то, что их ядра имеют в базальной стороне большие инвагинаты. Наряду со многими микропузырьками в цитоплазме встречается многопузырчатые тельца и небольшие каналцы гранулярной цитоплазматической сети, почти отсутствующие у эндотелиальных клеток венозных сосудов и синусов.

Под эндотелиальными клетками артериол располагается базальная мембрана, которая тесно соприкасается с плазматической мембраной. В составе гомогенного матрикса базальной мембраны, в их периферических зонах встречается и фибриллярные структуры. Нам не удалось обнаружить межклеточного материала, похожего на базальную мембрану, вокруг эндотелиальных клеток синусов.

2. Ретикулярные клетки

Из всех стромальных элементов преобладают ретикулярные клетки. Морфологически ретикулярные клетки не являются единообразными. Можно различить несколько типов ретикулярных клеток.

Менее дифференцированные ретикулярные клетки имеют более менее округлый вид (рис. 9а). В большом овальном или подковообразном ядре находится одно большое ядрышко. Хроматин почти не сконцентрирован возле ядерной оболочки. Цитоплазма заполнена рибосомами и полисомами, имеются и небольшие каналы гранулярной цитоплазматической сети и немного митохондрий.

В более дифференцированных ретикулярных клетках (рис. 9б) со светлой цитоплазмой располагаются относительно небольшое число рибосом в виде полисом, митохондрии, элементы гранулярной цитоплазматической сети в виде вакуолей и небольших канальцев и пузырьки разных размеров. Лизосомальные структуры встречаются редко. Иногда в перинуклеарной зоне видны аппарат Гольджи и центриоли. В ходе дифференцировки ретикулярных клеток в их ядре происходит концентрирование хроматина у ядерной оболочки. Клетки становятся отростчатыми, они приобретают пространные отростки, которые проникают вглубь между другими клеточными элементами селезенки.

В некоторых случаях наблюдаются контакты ретикулярных клеток с межклеточным электронноплотным материалом, в котором вследствие тесной расположенности обычно трудно различить фибриллы и волокна. Названный материал соответствует ретикулиновым волокнам, образующим своеобразный остов кровяных тканей. Проведенное исследование не позволяет нам ответить на вопрос, является ли данный межклеточный материал производным ретикулярных клеток или в его формировании участвуют фибробласты.

Среди ретикулярных клеток встречается и своеобразный тип ретикулярных клеток т.н. дендритные ретикулярные клетки. Эти клетки наблюдались только в селезенке кроликов.

Дендритные ретикулярные клетки (рис. 10а) имеют большие размеры (20–30 мкм). Длинные, расположенные по сторонам цитоплазматические отростки часто образуют сетевидные структуры вокруг этих клеток. В крупном ядре хроматин несколько сконцентрирован у ядерной оболочки. В цитоплазме имеется большое число рибосом и полисом, митохондрии, обнаруживаются элементы гранулярной цитоплазматической сети, отдельные ли-

щидые включения, немногие пузырьки и вакуоли (в том числе и многопузырчатые тельца) разного размера и типичные лизосомальные структуры. Форма элементов гранулярной цитоплазматической сети в виде небольших округлых вакуолей (0,3 мкм) является специфическим признаком. Реже около ядра наблюдается небольшой аппарат Гольджи и центриоли.

К анализу ультраструктуры дендритных клеток надо относиться с большой осторожностью, так как клеточные органеллы часто скапливаются в одной части цитоплазмы. Нередко наблюдалось скопление митохондрий (рис. 10б). При этом интересно отметить, что митохондрии часто отличаются друг от друга по размерам, иногда они имеют своеобразные кольцевидные формы. Клеточные отростки обычно лишены цитоплазматических органелл, кроме рибосом, или они содержатся лишь в незначительном количестве.

В некоторых случаях нам удалось наблюдать и митозы дендритных ретикулярных клеток. Часто эти клетки находятся в соседстве с фибробластами, и цитоплазматическая мембрана клеточного тела и отросток нередко имеют контакты с межклеточным материалом и (или) с узкими отростками фибробластов.

3. Фибробласты

Фибробласты в селезенке имеют отростчатый вид. Характерным признаком является большая электронноплотность их цитоплазмы, обусловленная наличием огромного количества рибосом. Среди фибробластов можно наблюдать клетки разной степени дифференцировки. Менее дифференцированные клетки имеют в своей цитоплазме, кроме большого количества рибосом, небольшое количество вакуолей и канальцев гранулярной цитоплазматической сети и отдельные многопузырчатые тельца. В цитоплазме высокодифференцированных клеток (рис. 11а) имеются расширенные канальцы цитоплазматической сети, единичные митохондрии со светлым матриксом, много светлых вакуолей, мультивезикулярные тельца и лизосомы. Наличие типичных аутофагических вакуолей, электронноплотных телоллизосом и многих везикул, располагающихся в зоне аппарата Гольджи, говорит о развитом лизосо-

мальном аппарате. В некоторых случаях мы наблюдали в цитоплазме фибробластов и фагоцитированные эритроциты. В ходе созревания фибробластов происходит и изменение формы ядер от овальной до неправильной формы. Увеличивается гетерохроматизация. Нередко около ядра располагается выраженный аппарат Гольджи, состоящий из нескольких диктосом. Фибробласты имеют часто тонкие цитоплазматические отростки шириной 0,5 мкм, которые проходят далеко от клеток внутрь ткани селезенки (рис. IIб). Фибробласты связаны с межклеточным материалом (т.н. ретикулином), тесно прилегающим к плазматической мембране (рис. I2б). В некоторых случаях в межклеточном материале можно отличить фибриллярную и волокнистую структуру.

Фибробласты делятся редко (найден лишь 2 митоза), но при этом интересно отметить, что внешняя конфигурация клеток (отростчатость) сохраняется во время митоза (рис. I2а).

Фибробласты в ткани селезенки располагаются не только отдельно, но они образуют и подэндотелиальный слой артериол, где происходит тесное скопление концентрически расположенных фибробластов.

4. Макрофаги

Характерные, свободно расположенные клетки с типичной структурой макрофагов встречаются редко. Найденные отдельные клетки с морфологией макрофагов находились в красной пульпе и содержали в своей цитоплазме обломки эритроцитов (рис. I3).

Кроме этих высокодифференцированных клеток макрофагального ряда, в изученных селезенках имеется клеточная категория, которая представляет собой оседлые макрофаги, входящие в состав стромы эмбриональной селезенки.

Оседлые макрофаги мышей характеризуются скорее всего электронноплотными цитоплазматическими гранулами разных размеров и форм (рис. I4). Эти структуры являются лизосомами. В светлой цитоплазме находятся большие митохондрии со светлым матриксом, большое количество мелких пузырьков, умеренное количество рибосом и небольшое число канальцев гранулярной цитоплазматической сети. Аппарат Гольджи развит мало, имеются

небольшие цистерны и пузырьки, которые располагаются вблизи ядра. В ядре, обычно неправильной формы, хроматин сконцентрирован возле ядерной оболочки. Надо отметить, что клеточные органеллы макрофагов располагаются в основном вокруг ядер и клеточные отростки почти лишены структурных элементов цитоплазмы.

Макрофагальные клетки селезенки кроликов в некоторой степени отличаются от соответствующих клеток мышей. В их цитоплазме имеется большое число гранул разного размера с электронноплотным матриксом (рис. 15). Часть из них окружена двумя мембранами. Мелкие электронноплотные гранулы имеют палочковидную или гантелеобразную морфологию. Имеются и многопузырчатые тельца фагосом, большое количество светлых, гладко-мембранных вакуолей, а также встречаются вакуоли гранулярной цитоплазматической сети. Между органеллами располагаются микрофиламенты.

Что касается центрального макрофага эритроидных островков, то здесь мы должны сказать, что типичных эритроидных колоний типа островка найдено мало и большинство из изученных центральных макрофагов имели скорее всего морфологию ретикулярных клеток (рис. 16). Но тем не менее можно предполагать, что вышеназванные свободные макрофаги с обломками эритроцитов происходят от центрального макрофага. Об этом свидетельствует не только фагоцитированные обломки, но и их расположение без исключения в зоне эритропоза.

Обсуждение

Структура селезенки эмбрионов перинатального возраста и новорожденных животных сформирована неокончательно. Хотя белая и красная пульпа уже различимы, типичные лимфоидные фолликулы еще не образованы. По литературным данным, образование лимфоидных фолликулов у крыс происходит не ранее чем через несколько недель после рождения /6/, но в отношении мышей и кроликов сходные данные отсутствуют. В настоящее время имеются убедительные данные, что первичные периартериоллярные

экопления лимфоцитов образуются в основном за счет Т-лимфоцитов /7, 8/.

В этой работе мы не будем касаться вопроса о дифференцировке кроветворных элементов, так как это сделано во многих исследованиях /9, 10/, результаты которых совпадают с нашими. Отметим лишь, что селезенка эмбрионов перинатального возраста и новорожденных животных является органом интенсивного гемопоэза. Основной линией дифференцировки является эритропоэз, но представлены и гранулопоэз в линии дифференцировки нейтрофильных и базофильных гранулоцитов, а также мегакариопоэз и тромбоцитогенез. Мы не нашли клеток эозинофильных гранулоцитов, а также производных лимфоцитов - плазматических клеток.

Большой интерес представляют собой стромальные клетки, которые в изученной стадии онтогенеза животных являются морфологически неоднородной популяцией клеток. Нами охарактеризованы 4 основных типа стромальных клеток: эндотелиальные, ретикулярные, фибробласты и клетки макрофагального ряда. Среди многих клеточных типов можно еще выделить несколько категорий клеток.

По нашим данным, эндотелиальные клетки артериол и синусов являются разными. Как литературные данные /11/, так и наши исследования показали, что эндотелиальные клетки артериальных сосудов являются высокими и во многих случаях закрывают артериолы, но эндотелиальные клетки, выстилающие венозные сосуды и синусов, плоские. В отличие от синусных эндотелиальных клеток, артериоллярные эндотелиальные клетки находятся в тесном контакте со сплошной базальной мембраной. Под синусным эндотелием базальная мембрана отсутствует. Связано ли это с неоконченным развитием названных структур неизвестно, так как по литературным данным эндотелиальные клетки синусов дефинитивной селезенки окружены пористым базальным слоем /12, 13, 14/. Кроме того, наши исследования показали, что базальная инвагинация ядер эндотелиальных клеток является специфическим признаком артериол. И в этом отношении наши данные не согласуются работами вышеназванных авторов /12, 14/. Из этих противоречий вытекает необходи-

мость подробного изучения клеточного состава и структуры терминальных васкулярных элементов селезенки в онтогенезе.

Наши исследования позволяют различать в селезенке эмбрионов и новорожденных животных фибробласты от ретикулярных клеток. Первые синтезируют межклеточные фибриллы и волокна, о чем свидетельствует их тесная связь с этим материалом.

Цитоплазматическая структура ретикулярных клеток неотличима от типичных соединительнотканых фибробластов, но она резко отличается от фибробластов в селезенке. Поэтому, может быть, название электронноплотных клеток, связанных с межклеточным материалом (в том числе и коллагеновыми волокнами), фибробластами справедливо только при отметке "фибробласты лимфоидных органов" (эти фибробласты имеются и в лимфоузлах), так как они морфологически отличаются от типичных соединительнотканых фибробластов.

Ретикулярные клетки обычно не имеют связи с межклеточным материалом (ретикулином и коллагеновыми волокнами) и тем они отличаются от фибробластов, несмотря на то, что их цитоплазматическая структура сходная с типичными фибробластами. Но фибробласты в селезенке именно по ультраструктуре цитоплазмы отличаются от типичных соединительнотканых фибробластов, хотя их связь с соединительноткаными фибриллами и волокнами, а также с аморфным материалом /15/ говорит о сходной функциональной способности. Можно предполагать, что вышесказанное морфологическое различие фибробластов и фибробластоподобных клеток действительно отражает и их разные функциональные свойства, которые связаны с их гистогенезом. Разумеется, проведенные нами чисто морфологические исследования не позволяют решать проблему об их взаимоотношениях в генезе.

Ретикулярные клетки созревают в селезенке от клеточных форм с менее выраженной цитоплазматической дифференцировкой. Не решена проблема, происходит ли их дальнейшее созревание в фибробластах, о чем могут свидетельствовать иногда встречающиеся контакты с соединительнотканым межклеточным материалом, или ретикулярные клетки являются окончательными клетками в своем ряду дифференцировки. В литературе имеются сведения об идентичности ретикулярных клеток и фибробластов /16/.

Но отсутствие морфологически установленных переходных форм между ретикулярными клетками и фибробластами позволяет усомниться в возможности дифференцировки или перехода (трансформации) ретикулярных клеток в фибробласты селезенки.

Литературные данные авторов, указывающих на гетерогенность клеточной категории ретикулярных клеток селезенки /17, 18/, хорошо согласуются с данными о существовании вышеназванных двух разных фибробластоподобных стромальных клеток в кроветворных органах /13, 19/. Наши данные не согласуются с работами, в которых указывается на наличие специальной мезенхимы или специальных ретикулярных клеток вокруг артериол /18/. Наши исследования отчетливо показывают, что эти клетки вокруг артериол не отличаются от фибробластов селезенки и они встречаются рассеяно и по всей ткани селезенки.

Особой клеточной категорией в изученной селезенке является дендритная ретикулярная клетка. Хотя мы рассматривали эти клетки в разделе "ретикулярные клетки", без сомнения, они представляют собой особый тип клеток, функция и сущность которых окончательно не решена /15, 20, 21, 22, 23/. Следует отметить, что в онтогенезе они появляются неодновременно у разных видов. Если у новорожденных мышей данные клетки отсутствуют, как показал Стейнман с сотрудниками /23/, то в селезенке изученных новорожденных или эмбрионов кроликов они хорошо отличимы от других стромальных клеток селезенки.

В настоящее время нет однозначного решения вопроса, можно ли клетки макрофагального ряда включать в систему клеток стромы кроветворных органов или они являются только блуждающими элементами.

Наши исследования показали, что в селезенке эмбрионов перинатального возраста и новорожденных животных существуют лишь единичные макрофаги с характерной ультраструктурой (большое количество лизосом разного типа в том числе и фагосомы). Это, с одной стороны, хорошо согласуется с литературными данными /24/. Но, с другой стороны, наличие в селезенке отростчатых стромальных клеток с электронноплотными гранулами указывает, что потенциальных макрофагов на изученном этапе онтогенеза гораздо больше. Действительно, морфоло-

гия охарактеризованных нами оседлых макрофагов соответствует интердигитирующим клеткам кроветворных и лимфоидных органов, неоднократно представляемых /25-29/. Хотя в литературе и высказывалось мнение об их происхождении от моноцитов /27/, это означает, что и по гистогенезу они являются идентичными типичным макрофагам, но непосредственных данных, которые могут подтвердить это мнение, пока не имеется.

Интересно отметить, что наши неопубликованные данные о культивировании эмбриональной селезенки показывают, что эти интердигитирующие клетки действительно осваивают характерные признаки макрофагов (формирование высоко развитого лизосомального аппарата), но тем не менее по ультраструктуре они несколько и отличаются от высокодифференцированных макрофагов.

Выводы

1. Селезенка эмбрионов перинатального возраста и новорожденных мышей и кроликов является органом интенсивного гемопоза.

2. Электронномикроскопически можно различить семь типов стромальных клеток.

3. Артериоларные эндотелиальные клетки находятся в тесном контакте с базальной мембраной, под синусным эндотелием базальная мембрана отсутствует.

4. Фибробласты в селезенке связаны с межклеточными фибриллами и волокнами; вокруг ретикулярных клеток соответствующие структуры отсутствуют.

5. Дендритные ретикулярные клетки отсутствуют в селезенке изученных мышей или их эмбрионов, но они имеются в селезенке кроликов того же возраста.

6. Оседлые макрофаги соответствуют интердигитирующим клеткам кроветворных и лимфоидных органов.

Л и т е р а т у р а

1. Tischendorf F. Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen. Die Milz. Berlin, Heidelberg, New York, 1969.
2. Комахидзе М.Э. Селезенка. М., 1971.
3. Thiel G.A., Downey H. The development of the mammalian spleen with special reference to its hematopoietic activity. *Am. J. Anat.*, 1921, 28, 279-339.
4. Djaldetti M., Bessler M.H., Rifkind R.A. Hematopoiesis in the embryonic mouse spleen: an electron microscopic study. *Blood*, 1972, 39, 826-841.
5. Humphrey C. D., Pittman E.F. A simple methylene blue-azure II basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections. *Stain Technol.*, 1974, 49, 9-14.
6. Pettersen J.C., Rose R.J. Marginal zone and germinal center development in the spleens of neonatally thymectomized and non-thymectomized young rats. *Am. J. Anat.*, 1968, 123, 489-501.
7. Streefkerk J.G., Veerman A.J.P. Histochemistry and electron microscopy of follicle lining reticular cells in the rat spleen. *Z. Zellforsch.*, 1971, 115, 524-542.
8. Joel D.D., Hess M.W., Cottler H. Magnitude and pattern of thymic lymphocyte migration in neonatal mice. *J. of Exptl. Med.*, 1972, 135, 907-923.
9. Федорова Н.А., ред., Нормальное кроветворение и его регуляция. М., 1976.
10. Metcalf P., Moore M.A.S. Hematopoietic cells. *Frontiers of Biology.*, Amsterdam, London, 1971, 24
11. De Lanney L.E., Ebert J.P., Coffman C.M., Mun A.M. On the chick spleen origin: patterns of normal development and their experimental modification. *Contr. Embryol.*, 1962, 37, 57-85.
12. Chen L.-T., Weiss L. Electron microscopy of the red pulp of human spleen. *Am. J. of Anat.*, 1972, 134, 425-428.
13. Баранов В.Н. Современные представления о тонкой структуре селезенки. *Архив анат.*, 1974, 68, 91-100.

14. Weiss L. The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat. Rec.*, 1976, 186, 161-184.
15. Steinman R.M., Adams J.C., Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J. of Exptl. Med.*, 1975, 141, 804-820.
16. Pictet J., Orci L., Forssmann W.G., Girardier L. An electron microscope study of the perfusion-fixed spleen. 1. The splenic circulation and the RES concept. *Z. Zellforsch.*, 1969, 96, 372-399.
17. Galindo B., Imaeda T. Electron microscope study of the white pulp of the mouse spleen. *Anat. Rec.*, 1962, 143, 399-416.
18. Holbyoke E.A., Latta J.S., McLean J.V. A study of the ultrastructure of the developing spleen in the albino rat. *J. Ultrastruct. Res.*, 1966, 15, 87-99.
19. Старостин В.И., Мичурин Т.В. Строма кроветворных органов и ее взаимоотношение со стволовой кроветворной клеткой. Морфология человека и животных. Антропология. Итоги науки и техники., ВИНТИ, М., 1977, 7.
20. Steinman R.M., Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.*, 1973, 137, 1142-1162.
21. Steinman R.M., Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.*, 1974, 139, 380-397.
22. Steinman R.M., Lustig P.S., Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties in vivo. *J. Exp. Med.*, 1974, 139, 1431-1445.
23. Tizard I.R., Holmes W.L. The dendritic cells of the guinea pig popliteal lymph node: identification and classification of cells observed by scanning electron

- microscopy. J. of RES., 1975, 17, 333-341.
24. McFadden K.D. Some reticuloendothelial cells in the white pulp region of the rat spleen. J. of RES., 1968, 5, 385-398.
25. Heusermann U., Stutte H.J., Müller-Hermelink H.K. Interdigitating cells in the white pulp of the human spleen. Cell Tissue Res., 1974, 153, 415-417.
26. Kaiserling E., Lennert K. Die interdigitierende Retikulumzelle im menschlichen Lymphknoten. Virchows Arch. B. Cell Path., 1974, 16, 51-61.
27. van Ewijk W., Verzijden J.H.M., van der Kwast Th.H., Luijck-Meijer S.W.M. Reconstitution of the thymus dependent area in the spleen of lethally irradiated mice. A light and electron microscopical study of the T-cell microenvironment. Cell Tissue Res., 1974, 149, 43-60.
28. Veerman A.J.P. On the interdigitating cells in the thymus-dependent area of the rat spleen: a relation between the mononuclear phagocyte system and T-lymphocytes. Blood, 1974, 43, 247-257.
29. Veerman A.J.P., van Ewijk W. White pulp compartments in the spleen of rats and mice. A light and electron microscopic study of lymphoid and non-lymphoid cell-types. Cell Tissue Res., 1975, 156, 417-422.

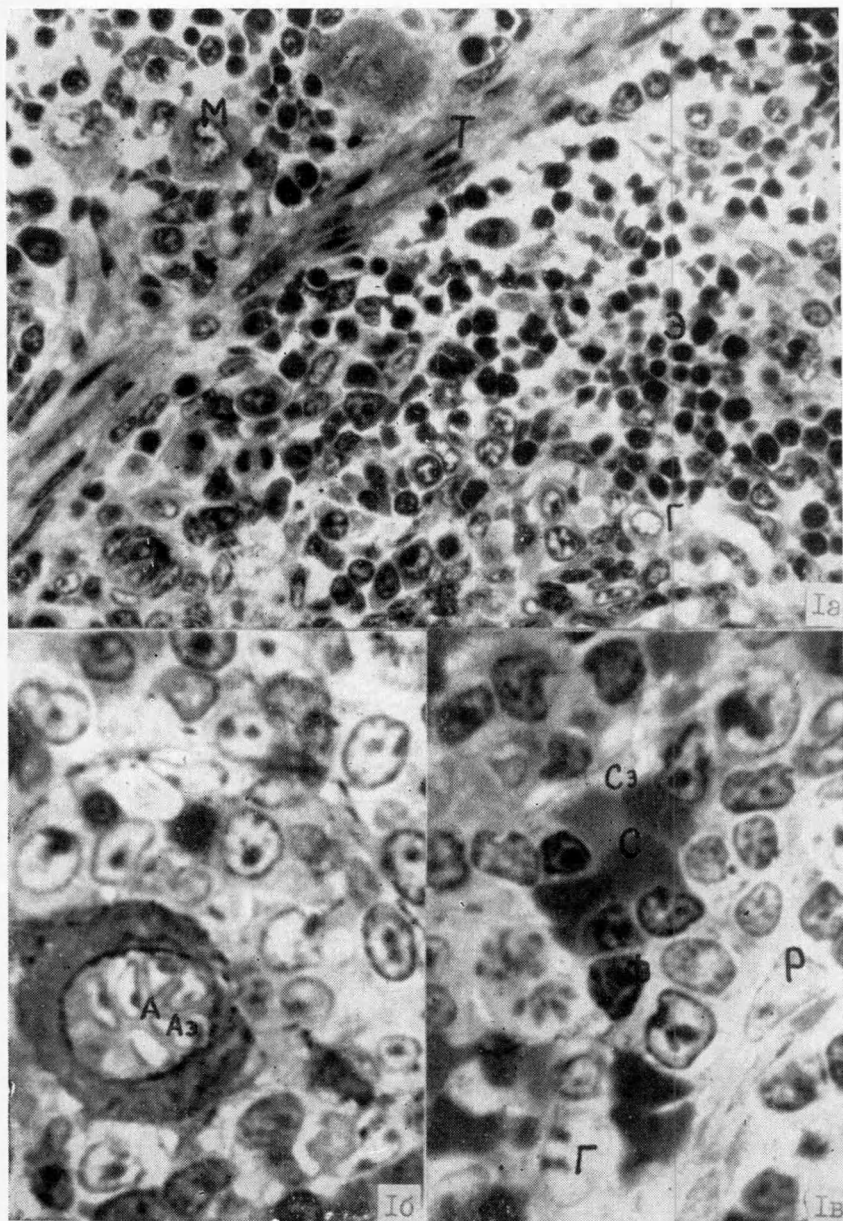


Рис. 1. Селезенка эмбриона мыши 20-дневного возраста. А — артериола, Аэ — артериолярные эндотелиальные клетки, С — синусы. Сэ — синусоидальные эндотелиальные клетки, Т — соединительнотканые трабекулы, Э — эритроидные клетки, М — клетки мегакариоцитарного ряда, Г — гемоцитобласты, Р — ретикулярные клетки, Ф — фибробласты. Метод Хамфри и Питмана 5. а) $\times 560$, б) $\times 1470$, в) $\times 1470$.

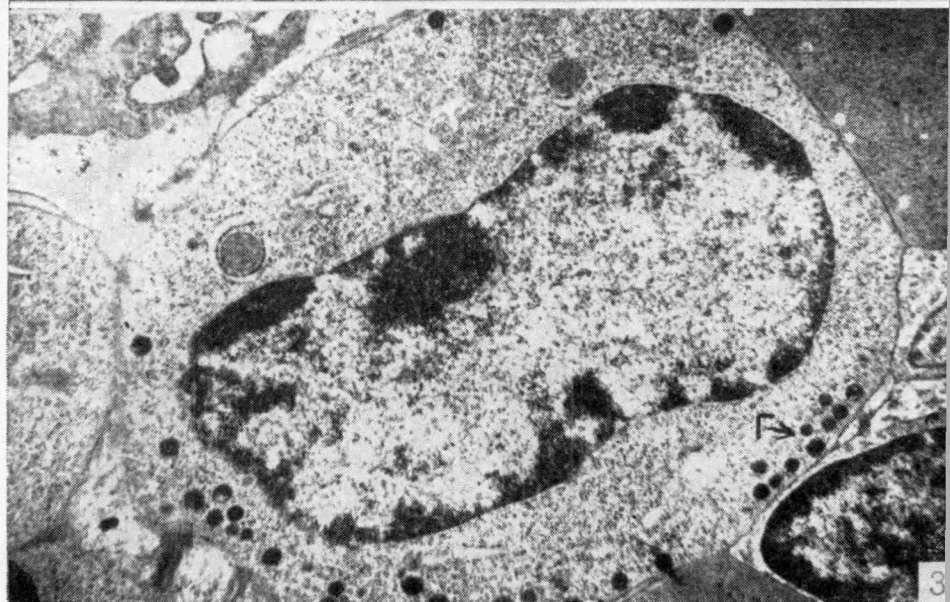
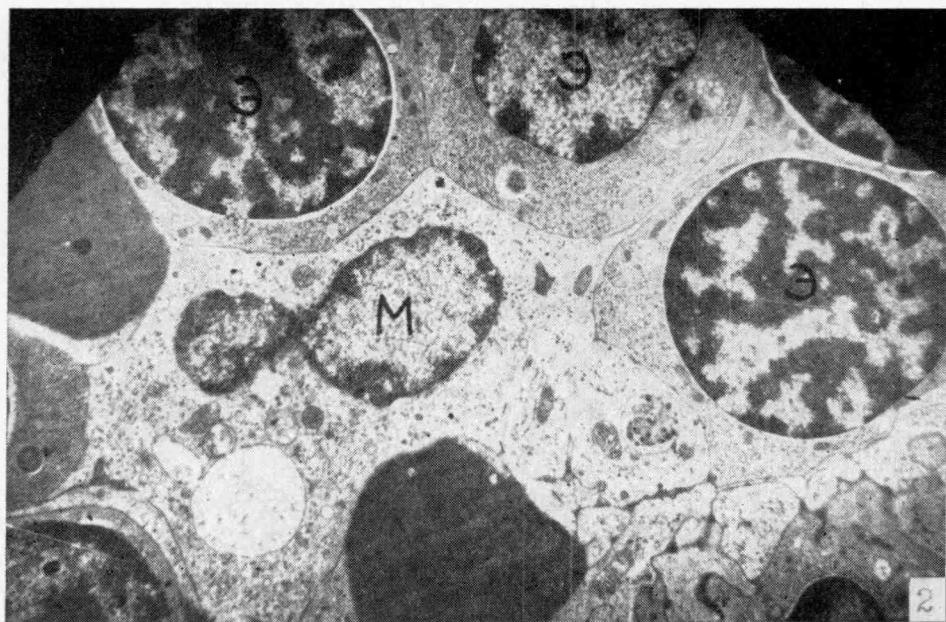


Рис. 2. Островок эритропоэза: Э — эритроидные клетки, М — макрофаг.
 $\times 10200$.

Рис. 3. Миелобласт: г — первичные гранулы. $\times 17000$.

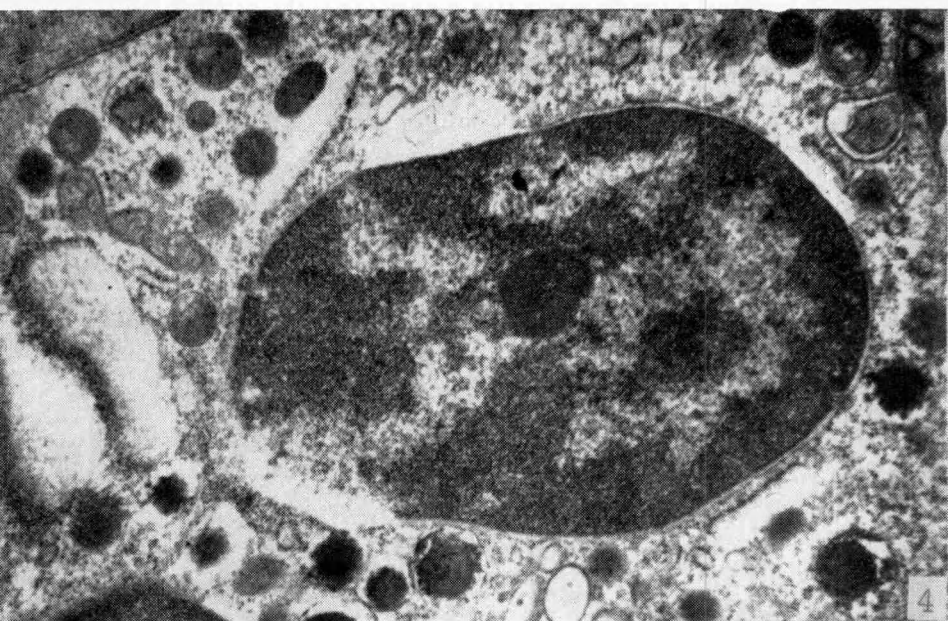


Рис. 4. Базофильный гранулоцит. $\times 18500$.
Рис. 5. Недифференцированная кроветворная клетка. $\times 11100$.

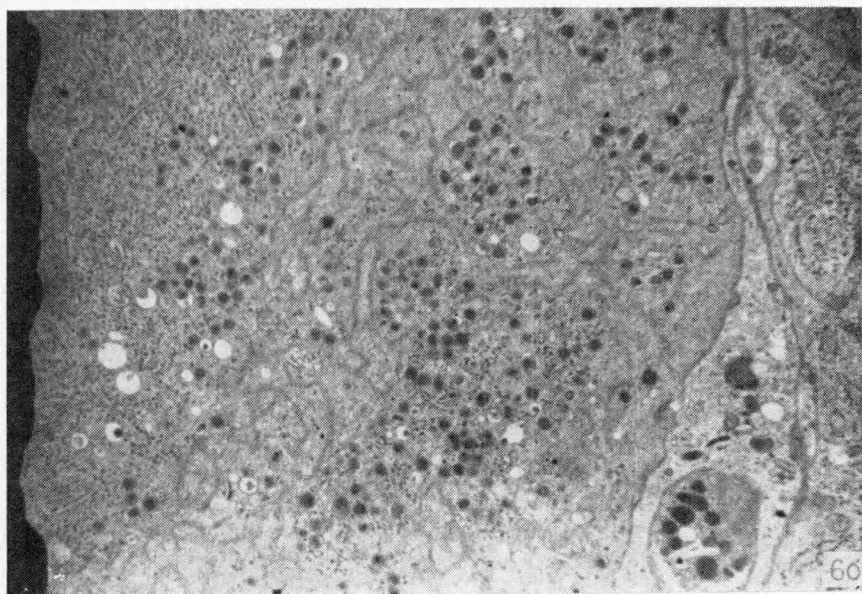
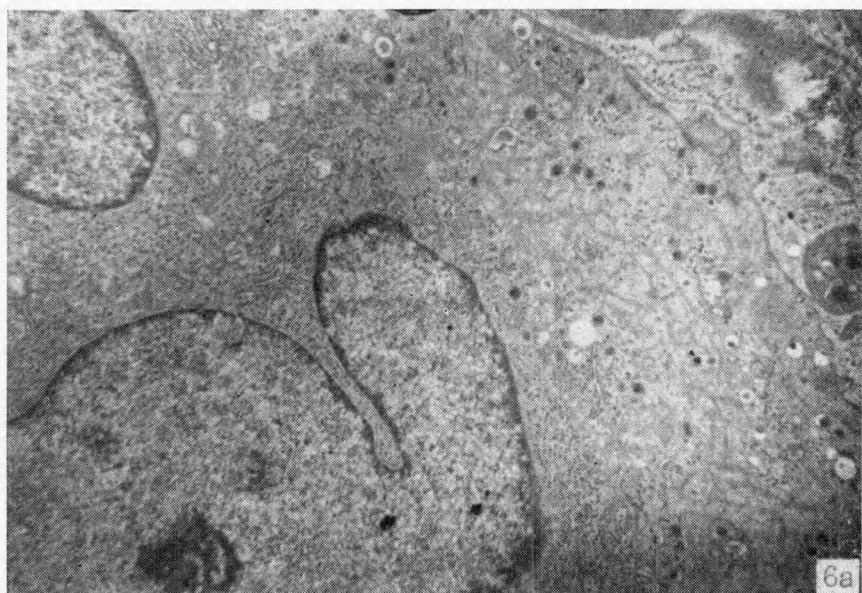


Рис. 6. Мегакарициты: а) общий вид, $\times 12600$, б) зона цитоплазмы с трубочками и гранулами, $\times 16000$.

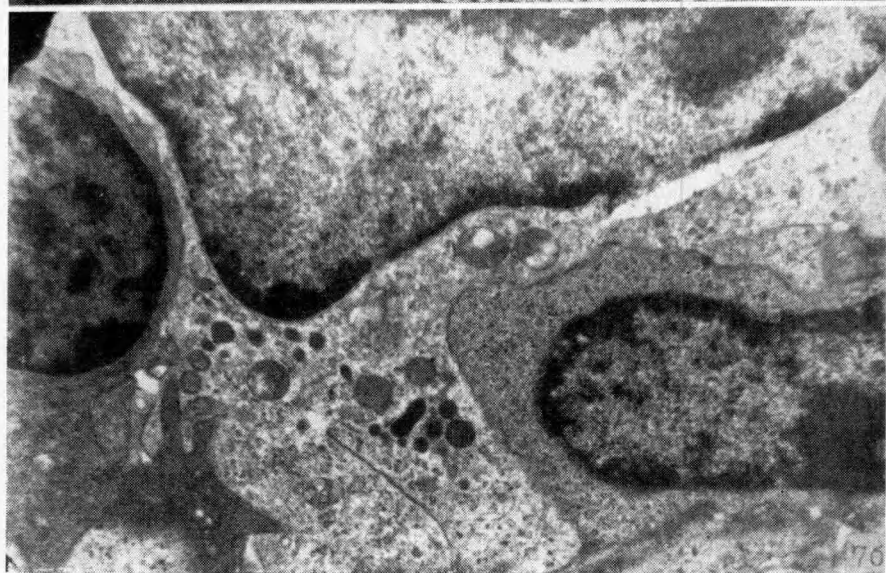
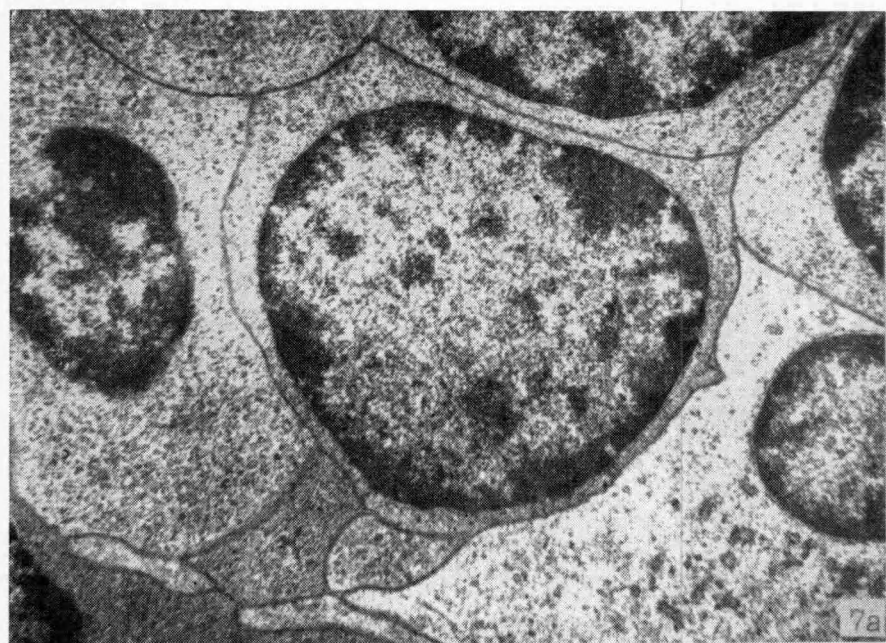


Рис. 7. Контакты лимфоцитов. а) между собой, б) со стромальными клетками, $\times 15000$.

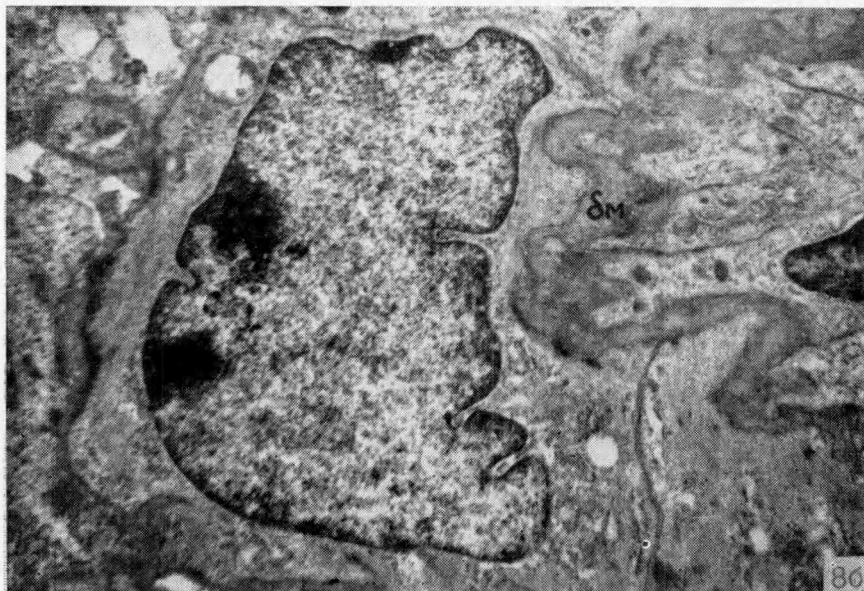
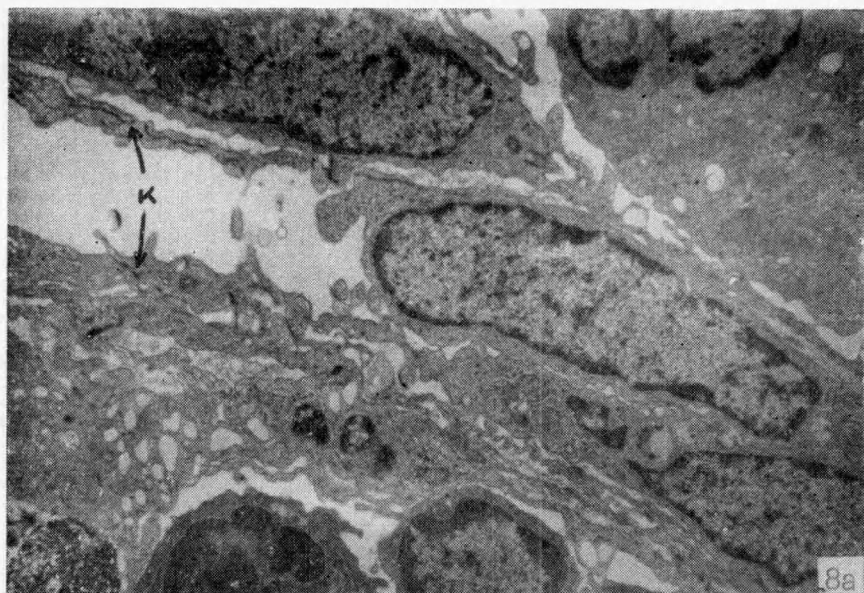


Рис. 8. Эндотелиальные клетки: а) синусов, к — контакты эндотелиальных клеток, $\times 8300$., б) артериол, бм — базальная мембрана, $\times 15000$.

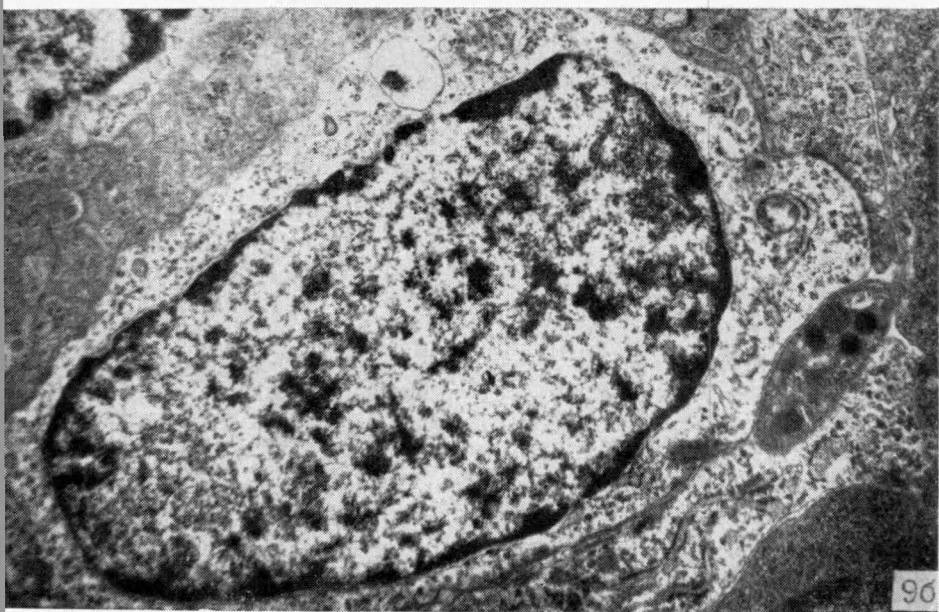
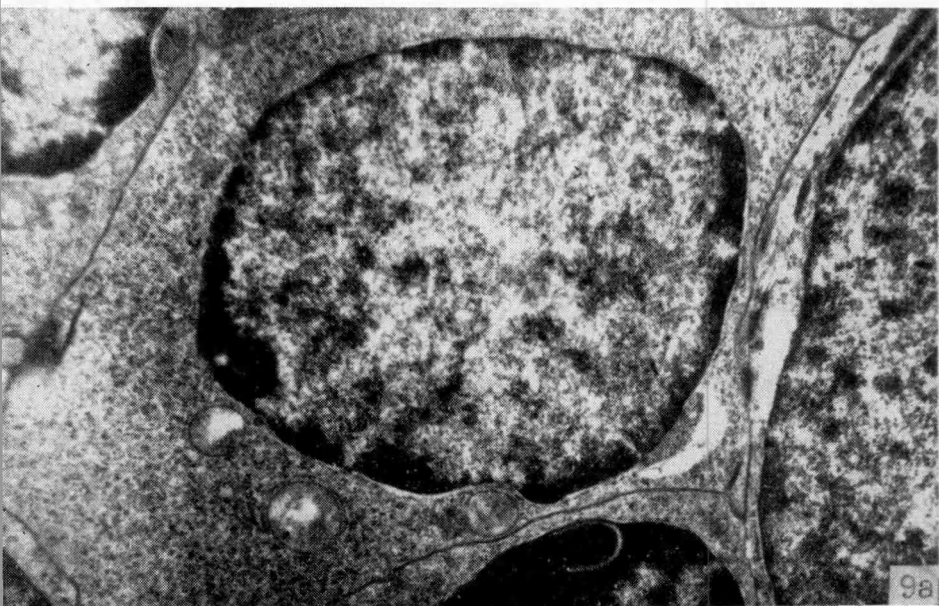


Рис. 9. Ретикулярные клетки: а) малодифференцированные, б) высокодифференцированные. $\times 15000$.

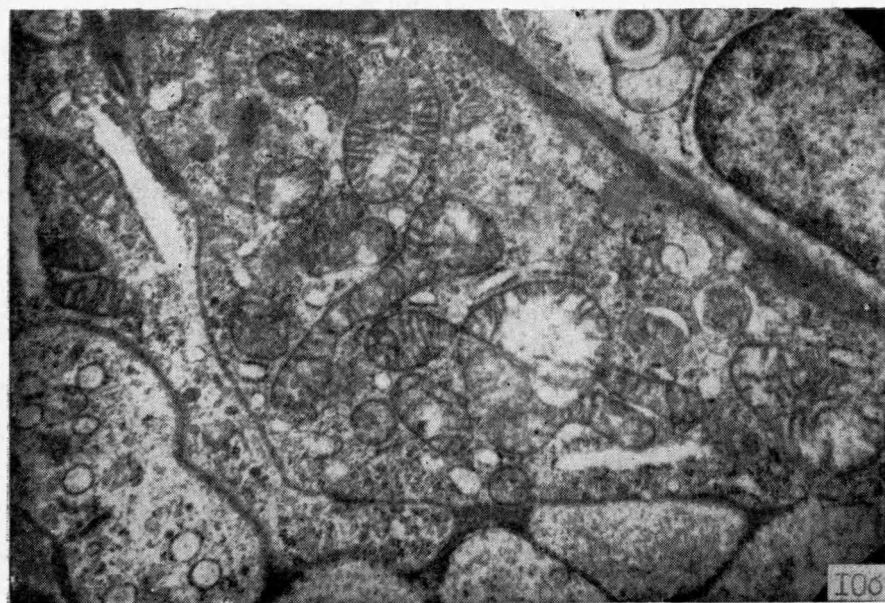
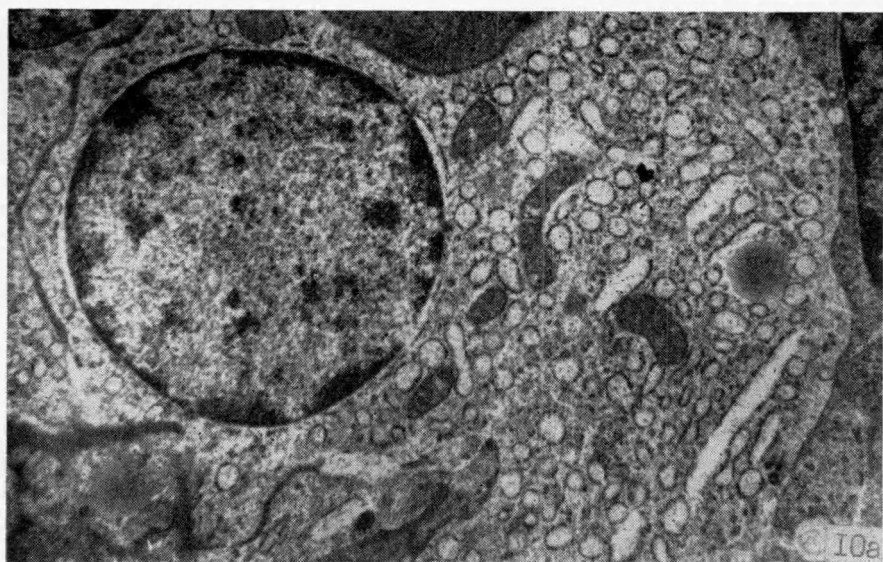


Рис. 10. Дендритные ретикулярные клетки: а) общий вид $\times 1500$, б) скопленные митохондрии в цитоплазме, $\times 18500$.

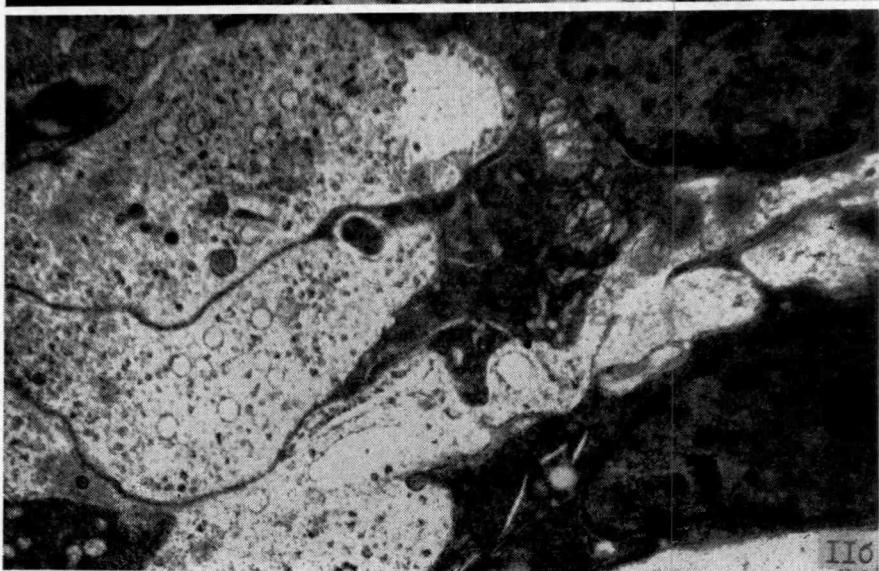
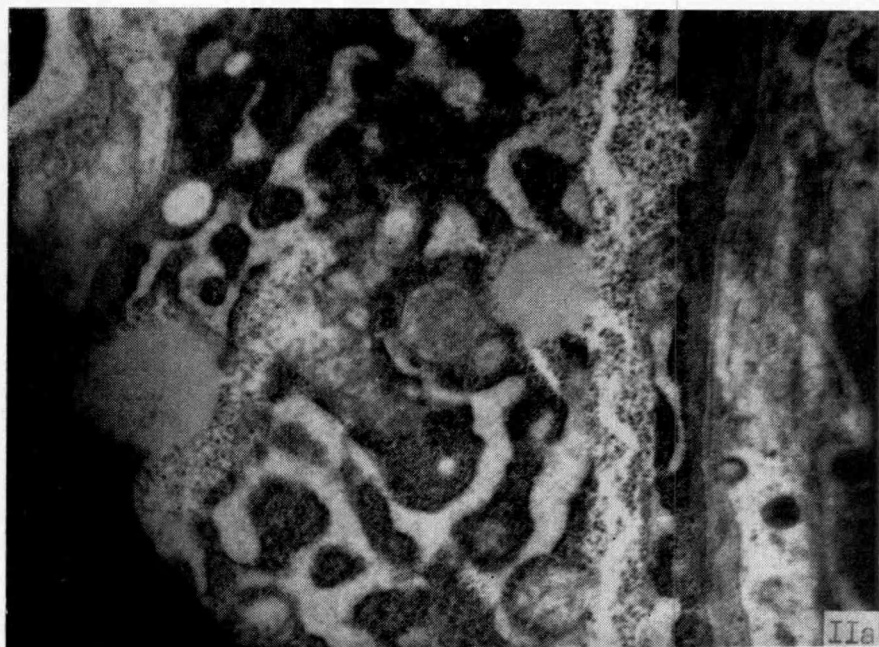


Рис. 11. Фибробласты: а) расширенные каналцы цитоплазматической сети, $\times 20700$., б) тонкие цитоплазматические отростки, $\times 16000$.

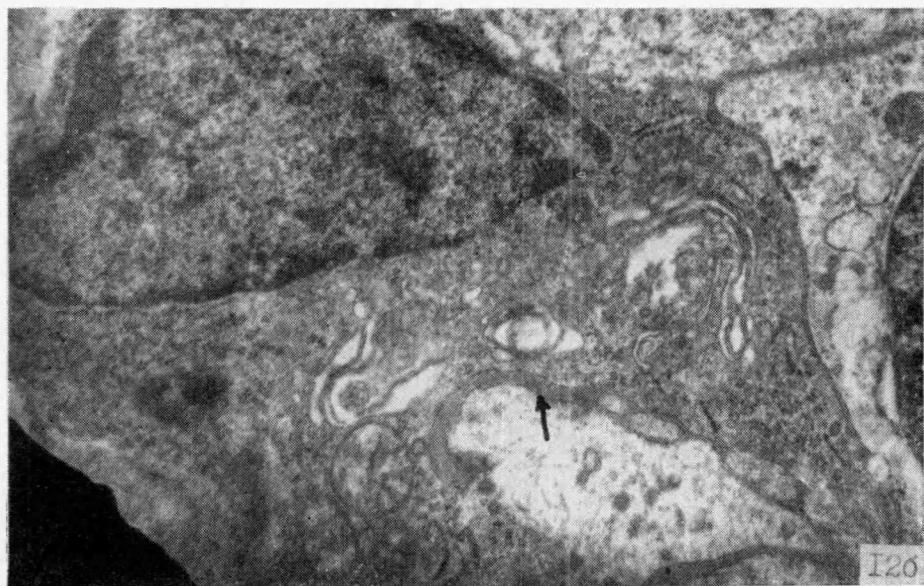
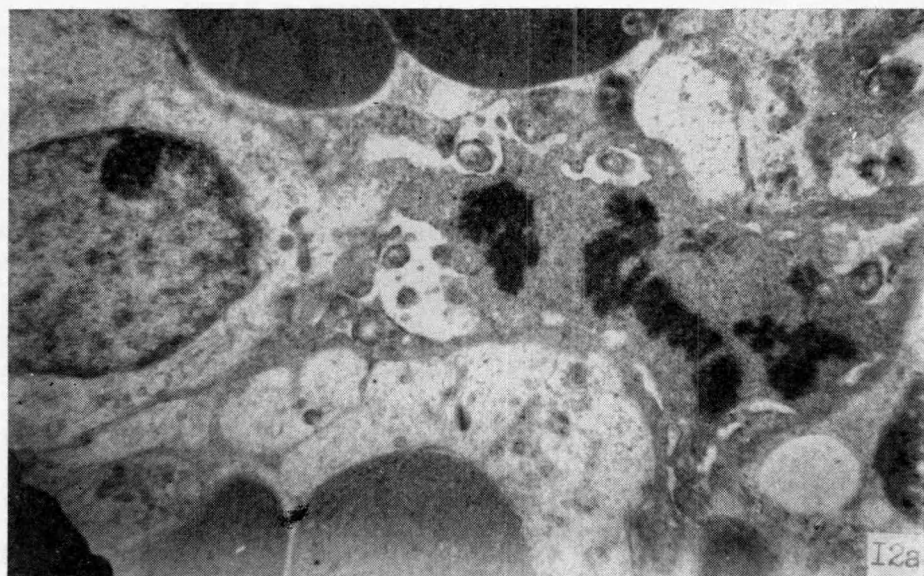


Рис. 12. Фибропласты: а) митоз фибробласта, $\times 8300$, б) связь с межклеточным материалом (\uparrow), $\times 18000$

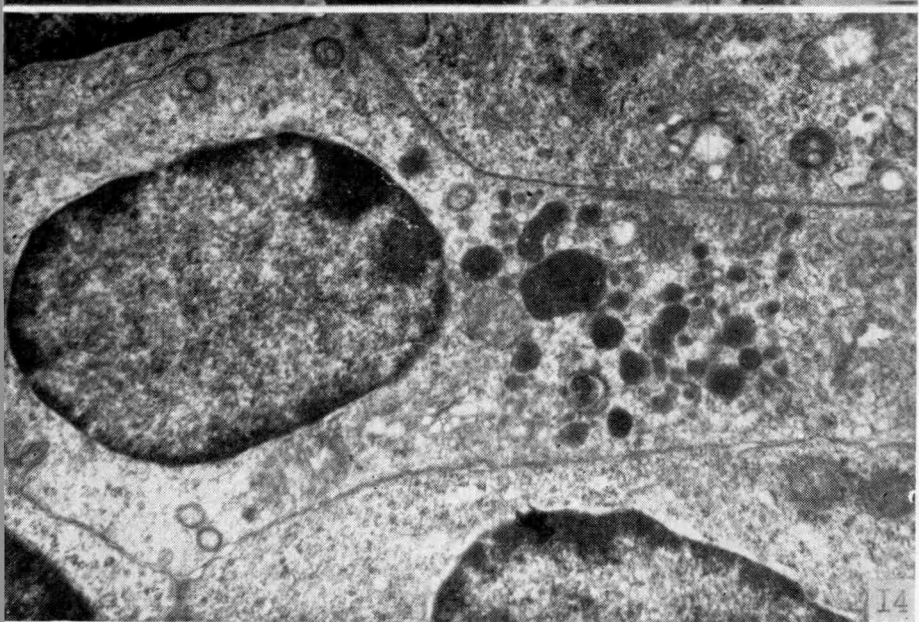
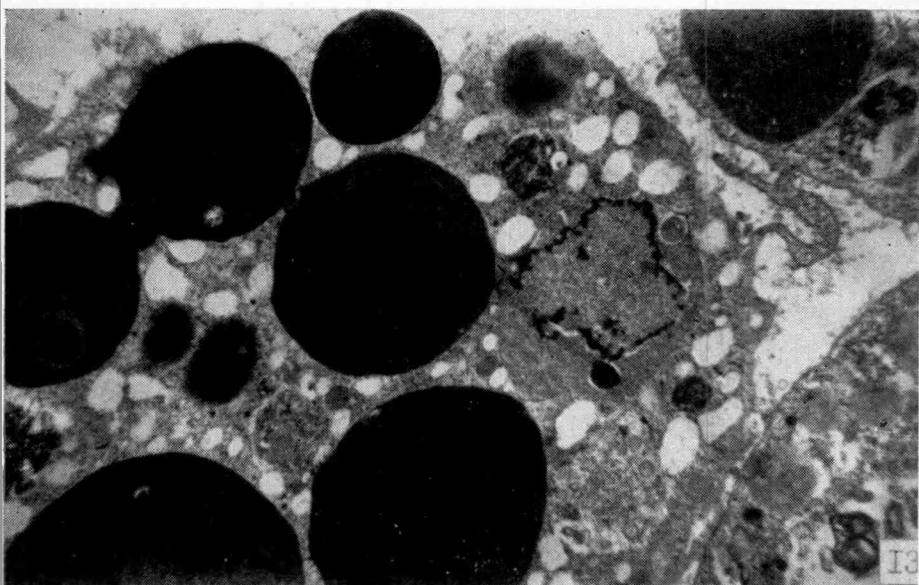


Рис. 13. Макрофаги с обломками эритроцитов в цитоплазме. $\times 8300$.
Рис. 14. Оседлые макрофаги с электронноплотными цитоплазматическими гранулами. $\times 18000$.

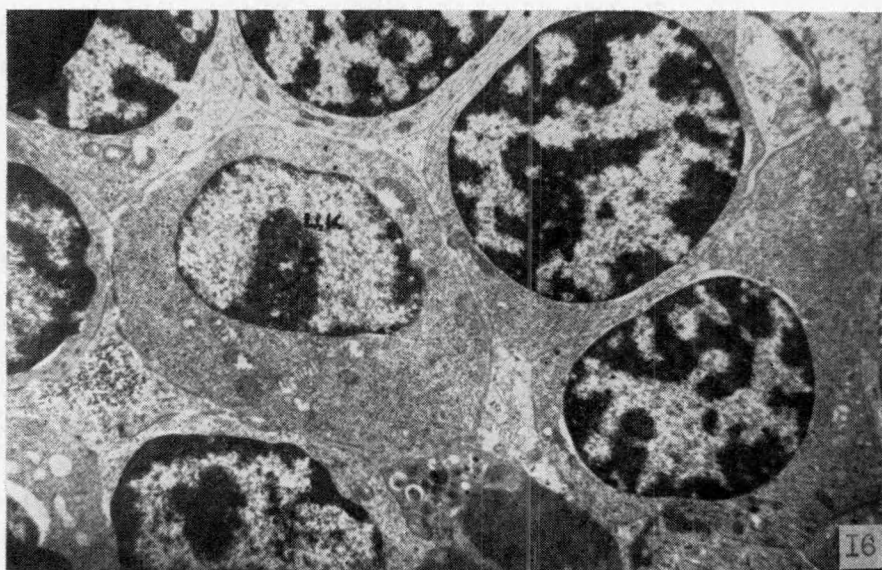
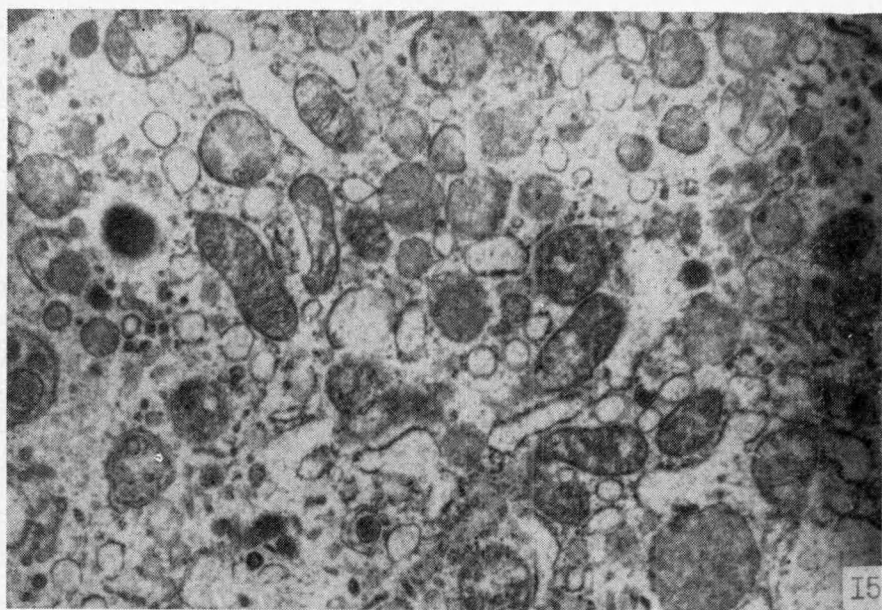


Рис. 15. Цитоплазма оседлых макрофагальных клеток кроликов: эг — электронноплотные гранулы. $\times 20700$.

Рис. 16. Эритроидный островок: цк — центральная клетка эритроидного островка. $\times 10200$.

The spleen cellular content of embryos and newborns

A. Piirsoo

S u m m a r y

A comparative light and electron microscopic study of the spleen of mice and rabbit embryos and newborns was performed. On the basis of ultrastructural and functional criteria 7 groups of stromal cells were distinguished: sinusoidal and arteriolar endothelial cells, reticular cells, fibroblasts, dendritic cells, mature macrophages and macrophages with electron dense granules.

Basement membrane matrix lay on or near the plasma membranes of arteriolar endothelium, while the association of basement membrane matrix with flattened sinusoidal endothelial cells was not evident. Fibroblasts associated closely with intercellular fibrils and matrix. Reticulum and dendritic cells showed a marked development of the endoplasmic reticulum. The dendritic cells were also characterized by widespread interdigitations. Macrophages with electron dense granules corresponded to the so-called interdigitating reticular cells.

ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ
ПОД ВЛИЯНИЕМ ТРАНСМИССИВНЫХ R- И Col-ПЛАЗМИД

Э.Т. Таллмейстер, О.П. Лайбус, А.Л. Хайнару

Уже давно известно явление лизогенной или фаговой конверсии у бактерий /1-2/. Некоторые умеренные фаги ведут себя как типичные плазмиды бактерий /3-4/. Поэтому нет ничего удивительного в том, что плазмиды бактерий тоже могут изменять многие биологические свойства бактерий. Описаны случаи изменения биотипа /5/, лизотипа /6-7/, колицинотипа /8-9/ и других свойств бактерий под влиянием R- и Col-плазмид бактерий. Некоторые авторы называют это явление плазмидной конверсией /10-11/.

В наших более ранних исследованиях было показано, что под влиянием некоторых комбинаций R- и Col-плазмид происходит торможение активности фермента конверсии β-фенилпропионовой кислоты, а также проявление свойства аукоотрофности у первоначальных прототрофных штаммов *Escherichia coli* /12-13/. В представленной статье приводятся данные об изменении разных биологических свойств энтеробактерий под влиянием трансмиссивных R- и Col-плазмид.

Материал и методика

Среды. Использовали мясопептонный бульон Хоттингера (рН 7,4), 0,5 и 1,5 %-ный мясопептонный агар, бромтимоллактозагар, среду Эндо, среду SCS /14/, минимальный агар Дависа и Мингиоли /15/. Антибиотики хлорамфеникол, тетрациклин и стрептомицин добавляли к средам в концентрации 25 мкг/мл, неомицин и налидиксиновую кислоту - 20 мкг/мл, бензилпенициллин - 500 ЕД/мл, сульфадимезин - 500 мкг/мл, ампициллин и рифампицин - 50 мкг/мл.

Штаммы. В опыт взяли 10 штаммов энтеробактерий, характеристика которых представлена в таблице I. Из этих штаммов *Salmonella heidelberg* A161 местный, а остальные - эталонные штаммы. Выделенные у местных штаммов *Shigella sonnei* R-

плазмиды R26, R35 и R36 /I6/ перенесены нами на ауксотрофные штаммы *E. coli* K12 J6-2.

Лекарственные вещества. Применяли отечественные препараты стрептомицинсульфат, тетрациклинхлорид, канамицинсульфат, хлорамфеникол, бензилпенициллин натрия, сульфадимезин, югославские препараты ампициллина натрия и рифампицина, налидиксимовую кислоту фирмы "Sigma".

Методы. Скрещивания бактерий, определение их колициногенности, частоту передачи и частоту спонтанной элиминации R- и Col-плазмид проводили по стандартной методике /I6/.

В первом этапе работы R-плазмиды $fin^+dxdR1-19$ (str, chl, amr, kan, sul), fin^-R26 (chl, tet, amr, sul), R35 (str, chl, tet, kan, sul), R36 (str, chl, tet, amr, sul) и fin^-Rts1 (kan) передавали от донорских штаммов *E. coli* K12 на местный штамм *S. heidelberg* A161 R⁻ColIb. R⁺Col⁺ рекомбинанты селективировали на селективной среде с добавлением хлорамфеникола или канамицина в концентрации 25 мкг/мл. Во втором этапе работы изучали передачу R- и ColIb-плазмид от штамма *S. heidelberg* A161 R⁺ColIb на штаммы *E. coli* Stocke W R⁻Col⁻ и Su 3912/41 R⁻Col⁻ и на штамм *Sh. flexneri* Y 7919 R⁻Col⁻. Селекцию рекомбинантов проводили на среде Эндо с добавлением хлорамфеникола или канамицина и налидиксимовой кислоты в концентрации по 25 мкг/мл. В параллельных опытах изучали передачу названных R-плазмид от донорских штаммов *E. coli* на вышеприведенные три штамма реципиентов.

У всех изученных штаммов бактерий, в том числе у рекомбинантов, были изучены следующие биохимические и другие биологические свойства: способность к сбраживанию сахаров на малом пестром ряде, реакции IMVC-теста, способность к продукции H₂S /I7/ и фермента конверсии В-фенилпропионовой кислоты /I8/, способность роста на минимальной среде, ауксотрофность и тип ауксотрофности /I9/, наличие фимбрий I-го типа /20/ и антигенные свойства /I7/. Специфические агглютинирующие антисыворотки для типизации серотипов *E. coli* O111:K58:H2 и O55:K59:H2 и штамма *Sh. flexneri* Y 7919 были получены из Ленинградского института эпидемиологии и микробиологии им. Л. Пастера.

Таблица I

Характеристика использованных штаммов бактерий и их плазмид

№ в/п	Штамм бактерий	Тип плазмиды	Используемые маркеры		
			lac	реакция с ФПК	рост на минимальной среде
1.	<i>E. coli</i> K12 J5-3	fin ⁺ R1-19 (str, chl, amp, kan, sul)	+	-	pro, met
2.	<i>E. coli</i> K12 J5-3	fin ⁻ Rts1 (kan)	+	-	pro, met
3.	<i>E. coli</i> K12 J6-2	R ⁻ Col ⁻	-	-	pro, his, trp
4.	<i>E. coli</i> K12 J6-2	fin ⁻ R26 (chl, tet, amp, sul)	-	-	pro, his, trp
5.	<i>E. coli</i> K12 J6-2	R35 (str, chl, tet, kan, sul)	-	-	pro, his, trp
6.	<i>E. coli</i> K12 J6-2	R36 (str, chl, amp, sul)	-	-	pro, his, trp
7.	<i>E. coli</i> Su 3912/41 (O55:K59:H2)nal-r	R ⁻ Col ⁻	+	+	+
8.	<i>E. coli</i> Stocke w (O111:K58:H2)nal-r	R ⁻ Col ⁻	+	+	+
9.	<i>Sh. flexneri</i> Y 7919 nal-r	R ⁻ Col ⁻	-	+	glt
10.	<i>Salmonella heidelberg</i> A161 str-r	R ⁻ ColIb	-	-	+
11.	<i>E. coli</i> B Col ^s	R ⁻ Col ⁻	+	-	+

Примечание. Гены резистентности R-плазмиды к стрептомицину (str), хлорамфениколу (chl), тетрациклину (tet), ампициллину (amp), канамицину (kan) и сульфениламидам (sul). Хромосомная резистентность к налидиксиновой кислоте (nal-r) и к стрептомицину (str-r). Неспособность (-) или способность (+) к сбраживанию лактозы (lac); положительная (+) реакция с 8-фенилпропионовой кислотой (ФПК) и способность роста (+) на минимальной среде; pro - пролин, met - метионин, trp - триптофан, glt - глутаминовая кислота.

Для обогащения спонтанных ауксотрофных мутантов клетки обрабатывали бензилпенициллином /2I/.

Результаты исследований

Частота передачи R-, Col- и R⁺Col⁺-плазмид в процессе конъюгации колебалась в широких пределах в зависимости от применяемых штаммов бактерий, а также от изученных плазмид. Штаммы *S. heidelberg* A161 и *Sh. flexneri* Y 7919 являлись плохими реципиентами. С другой стороны, частота передачи R⁺Col⁺ плазмидного комплекса осуществлялась на штаммы *E. coli* с очень высокой частотой. Во всех случаях, как правило, осуществлялась совместная передача R- и Col⁺-плазмид.

У около 70% трансконъюгантов штамма *E. coli* Stocke W серотипа OIII:K58:H2 приобретение плазмиды fin⁺R1-19Col⁺ сопровождалось проявлением ауксотрофности. Среди культур, приобретших плазмиды fin⁻Rts1Col⁺ и R36Col⁺, таких конъюгантов было гораздо меньше - от 3 до 48%. Совместная передача плазмид fin⁻R26Col⁺ на штамм *E. coli* Stocke W не сопровождалась проявлением ауксотрофности. Среди R⁺Col⁺-рекомбинантов штамма *E. coli* Su 3912/41 серотипа O55:K59:H2 ауксотрофных вариантов не было обнаружено. При определении типа ауксотрофности выяснилось, что подавляющее большинство культур являлись ауксотрофными по метионину. Оставшаяся часть ауксотрофных мутантов были полиауксотрофными. Попытка выделить ауксотрофы среди прототрофных R⁺Col⁺ культур *E. coli* оказалась безуспешной даже в случае, если был применен метод обогащения ауксотрофов бензилпенициллином.

Как среди ауксотрофных, так и прототрофных конъюгантов штаммов *E. coli* Stocke W и Su 3912/41, несущих R1-19Col⁺ плазмиды, активность фермента конверсии β-фенилпропионовой кислоты была заторможена. Поэтому цветная реакция, происходящая при росте исходных штаммов Stocke W и Su на мясопептонном агаре с добавлением β-фенилпропионовой кислоты, становилась полностью отрицательной после приобретения плазмиды R1-19Col⁺ и она не восстанавливалась даже у клонов-элими-

чантов после спонтанной элиминации R1-19 и ColIb-плазмид. Следует еще отметить, что после приобретения R1-19ColIb плазмиды культуры штамма *E. coli* Stocke W серотипа OIII:K58:H2 теряли способность ферментировать сахарозу, хотя использование этого углевода является типичным для представителей серотипа *E. coli* OIII:H2.

При постановке развернутой реакции агглютинации выяснилось, что прогретые культуры конъюгантов обоих изученных нами серотипов *E. coli* агглютинировались в гомологической сыворотке ее титра, в то время как в опыте с живыми культурами отмечалось в среднем четырехкратное снижение титра агглютинации. Кроме того, многие R⁺ColIb трансконъюганты перестали агглютинировать эритроциты морской свинки, что типично для штаммов кишечных палочек, несущих фимбрии I-го типа. Это явление было сильно выражено в случае R1-19ColIb плазмидного комплекса.

При изучении штамма *Sh. flexneri* Y 7919 нам удалось ему передавать только плазмиды Rts1, R26 и ColIb. Выяснилось, что все рекомбинанты, несущие Rts1ColIb и R26ColI плазмиды, по сравнению с первоначальным штаммом, не дали цветную реакцию с β -фенилпропионовой кислотой. Кроме того, отмечалось не менее четырехкратное снижение титра в развернутой реакции агглютинации этих культур с гомологичной видовой сывороткой. Однако агглютинабельность культур была восстановлена кипяченой взвесью этих микробов. Было еще выявлено, что Rts1ColIb и R26ColIb рекомбинанты штамма *Sh. flexneri* Y перестали ферментировать мальтозу и давать рост на минимальной среде с добавлением глютаминовой кислоты.

Мы проверяли также у сохраненных на 7 ... 21 день культур штаммов-рекомбинантов *E. coli* Stocke W и *Sh. flexneri* Y 7919 явление спонтанной элиминации генов резистентности в зависимости от типа R-плазмиды, а также от наличия или отсутствия ColIb плазмиды в бактериальной клетке. При изучении более 3000 отдельных колоний методом реплик выяснилось, что элиминация r-генов происходит значительно чаще (34 ... 98%) среди конъюгантов штамма *E. coli* Stocke W, несущих R-плазмиды *fin*⁻Rts1, *fin*⁻R26, R35 и R36 вместе с плазмидной ColIb, чем

среди конъюгантов с теми же R-плазмидами, но без ColIb-плазмиды (3 ... 11%). Такой разницы не наблюдалось среди рекомбинантов этого же штамма *E. coli*, несущих плазмиду fin^+R1-19 , и среди рекомбинантов штамма флекснера с плазмидами fin^+Rts1 и Rin^+R26 по сравнению с R^+ColIb вариантами этих же штаммов. Наряду с элиминацией целого комплекта r-генов из R-плазмид происходит выборочная элиминация отдельных генов резистентности из R-плазмид.

Обсуждение

В настоящее время хорошо известны т.н. метаболические плазмиды, такие как F-lac, P-lac, F-gal, H_2S и другие /23/. Эти плазмиды были первоначально выявлены у природных, т.н. атипичных штаммов бактерий. Кроме метаболических плазмид, выявленных у природных штаммов бактерий, экспериментально получены, с применением методов генетической инженерии, плазмиды, несущие всевозможные гены бактериальной хромосомы /22/. С другой стороны, известны многие случаи плазмидной конверсии, где плазмидные гены не только кодируют свои специфические функции, но могут одновременно оказывать разнообразное влияние на клетку-хозяина. Многие такие изменения, как изменение лизотипа /6-7/, серотипа /24/ и колицинотипа /8-9/ связываются, вероятно, с изменениями структуры клеточной стенки, имея в виду, что плазмиды определяют синтез плазмидоспецифических антигенов /25-26/ и половых ворсинок /27/, являющихся рецепторами для некоторых фагов /28/. В свете вышеприведенных данных можно объяснить изменение антигенных свойств и отсутствие продукции фимбрий I-го типа у изученных нами штаммов *E. coli* серотипов O111:K58:H2 и O55:K59:H2 влиянием некоторых R^+ColIb -плазмид. Все-таки остается неясным, почему такой эффект проявляется под влиянием комплексных плазмид R^+ColIb , а не под влиянием только соответствующих R- и ColIb-плазмид в отдельности.

Некоторые плазмиды и фаги могут вызывать аукотрофность штамма-хозяина после их интеграции с хромосомной бактерией.

Так, фaг M₁ вызывает ауксотрофность высокой частоты на разных генах хромосомы бактерий /29/. Некоторые специфические плазмидные гены или транспозоны (например Tn5) вызывают после интеграции хромосомную мутацию /30/. Можно предполагать, что изученные R⁺ColIb плазмидные комплексы имеют сходные свойства. Не исключена и возможность, что изученные нами плазмиды определяют общую нестабильность бактерии-хозяина. В литературе имеются данные, что R-плазмиды могут значительно повысить чувствительность бактериальных клеток к мутагенным и канцерогенным факторам /31-32/. Хотя на основе этого можно объяснить выявленное нами торможение синтеза фермента конверсии β-фенилпропионовой кислоты и невозможность ферментировать некоторые углеводы в связи с мутациями в соответствующих генах-регуляторах, эта возможность кажется маловероятной, так как прототрофные R⁺ColIb клоны являлись стабильными.

Факты, что R⁺ColIb плазмидные комплексы вызывают иногда разные эффекты на разных изучаемых нами штаммах бактерий, можно объяснить на основе литературных данных, где показано, что, например, R-плазмиды ведут себя по-разному в разных штаммах и видах бактерий /33/.

Нами была отмечена повышенная частота спонтанной элиминации R-плазмид fin⁻Rts1, fin⁻R26, R35 и R36 из R⁺ColIb плазмидных комплексов в штамме E. coli Stocke W по сравнению с соответствующими R⁺Col⁻ штаммами бактерий. Так как ColIb-плазмиды относятся к группе несовместимости fin⁻, они должны быть несовместимыми с другими fin⁻ плаزمидами /34/. Поэтому R-плазмиды R35 и R36 должны тоже относиться к типу несовместимости fin⁻, хотя специальные опыты для проверки этого явления не были поставлены. С другой стороны, наши данные показывают, что изученные как fin⁺, так и fin⁻ R-плазмиды должны одинаковым образом рекомбинировать или ассоциировать с fin⁻ColIb-плазмидой. В противоположном случае трудно объяснить аналогичные эффекты этих разных плазмидных комплексов. Можно предполагать, что рекомбинация или ассоциация двух несовместимых плазмид является нестабильной, что приводит к элиминации одного или обеих плазмид из бактерий. В стабильных R⁺Col⁺ культурах Col-плазмиды не влияют на частоту элимина-

ции R-плазмид /35/.

Сущность отмеченных нами явлений можно выявить с помощью молекулярно-биологических исследований. Следовало бы исследовать и сходные системы с применением стандартной ColIb-плазмиды.

Итак, приобретение некоторых комплексных плазмид может вызывать изменения многих биологических свойств штаммов энтеробактерий, что может служить причиной ошибок при идентификации выделенных микробов. Для предотвращения таких ошибок следовало бы все атипичные штаммы энтеробактерий подвергать всестороннему изучению на наличие разных плазмид.

Выводы

1. Определенные fin^- и fin^+ -плазмиды совместно с ColIb-плазмидой штамма *Salmonella heidelberg* A16¹ вызывают изменения многих биологических свойств штаммов *E. coli* и *Sh. flexneri*.

2. Под влиянием некоторых R⁺ColIb-плазмид затормаживается синтез фермента конверсии β-фенилпропионовой кислоты, бактерии становятся ауксотрофными преимущественно в отношении метионину и неспособными ферментировать сахарозу или мальтозу и продуцировать фимбрии I-го типа, а также изменяются антигенные свойства.

3. fin^-R -плазида в составе R⁺ColIb плазмидного комплекса является нестабильной и элиминируется из бактериальных клеток.

4. Для предотвращения ошибок при идентификации выявленных природных микробов следовало бы подвергать все атипичные штаммы энтеробактерий всестороннему изучению на наличие разных плазмид.

Л и т е р а т у р а

1. Groman, N.B., Eaton, M., Booker, Z. Studies of mono- and polylysogenic *Corynebacterium diphtheriae*. J. Bacte-

- riol., 1958, 75, 320-325.
2. Hayes, W. The genetics of bacteria and their viruses. Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, Second Edition, 3rd Printing, 1968, 646-649.
 3. Chakrabarty, A.M., Gunsalus, I.C. Defective phage and chromosome mobilization in *Pseudomonas putida*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1969, 64, 1217-1223.
 4. Mukai, T., Matsubara, K. Conjugal transfer of plasmid *dv*. Biochem.Biophys.Res.Communs., 1977, 77, 818-823.
 5. Tschäpe, H., Rische, H. Ökologie und epidemiologische Bedeutung die infektiösen Chemotherapeutikaresistenz. Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie. Leipzig, 1974, 22, 1-102.
 6. Anderson, E.S. Influence of the delta transfer factor on the phage sensitivity of *Salmonella*. Nature, 1966, 212, 795-799.
 7. Guinée, P.A.M., Scholters, R.T., Willems, H.M.C.C. Influence of resistance-factors on the phage types of *Salmonella panama*, Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., 1967, 33, 30-40.
 8. Siccardi, A.G. Colicin resistance associated with resistance factors in *Escherichia coli* K12. Genet.Res., 1966, 8, 219-228.
 9. Хейнгару А.Л., Таллмейстер Э.Т. Изучение чувствительности к колицинам у штаммов шигелл и кишечных палочек в зависимости от факторов эпизомной резистентности и колициногенности или S-R форм диссоциации. - Генетика, 1971, 7, 113-122.
 10. Кудлай Д.Г., Чубуков В.Ф., Оганесян М.Г. Генетика лекарственной устойчивости бактерий. М., 1972.
 11. Мейнелл Г. Бактериальные плазмиды. М., "Мир", 1976.
 12. Таллмейстер Э.Т., Тюри Э.И. Передача эпизомной резистентности к антибиотикам в организме подопытных животных. Сб. докл. П респ. съезде эпидемиол., микробиол., инфекцион., гигиен. Таллин, Минздрав ЭССР, 1972, 87.

13. Галлмейстер Э.Т., Хейнару А.Л. Изменение активности фермента конверсии В-фенилпропионовой кислоты штаммов *Escherichia coli* под действием трансмиссивных плазмид *Salmonella heidelberg*. - Генетика, 1975, II, 90-95.
14. Wilkins, B.M., Hollom, S.E. Conjugational synthesis of Flac^+ and ColI DNA in presence of rifampicin and in *Escherichia coli* K12 mutants defective in DNA synthesis. *Molec. gen. Genet.*, 1974, 134, 143-156.
15. Davis, B.D., Mingioli, E.S, Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamine B_{12} . *J. Bacteriol.*, 1950, 60, 17-28.
16. Хейнару А.Л., Таллмейстер Э.Т. R-факторы и поведение их детерминантов у штаммов энтеробактерий различного происхождения. - Генетика, 1971, 7, 130-140.
17. Sedláč, J., Rische, H. *Enterobacteriaceae - Infektionen*. Veb. G. Thieme, Leipzig, 1961, 23-42.
18. Ben Hamida, F. *Metabolisme de l'acide В-phenylpropionique par Escherichia coli*. Thèse doctorat es-Sciences. Paris, 1964.
19. Lederberg, J. Isolation and characterization of biochemical mutants of bacteria. *Methods Med. Res.*, 1950, 3, 5-22.
20. Duguid, J.P. The function of bacterial fimbriae. *Arch. immunol. et therap. exptl.*, 1968, 16, 173-188.
21. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., "Мир", 1976, 214-218.
22. Carbon, J., Clarke, L., Ilgen, Ch., Ratzkin, B. The construction and use of hybrid plasmid gene banks in *Escherichia coli*. In: *Recombinant molecules: impact on science and society*. Ed. by Beers, R.F., Bassett, E.G. Raven Press, New York, 1977, 355-378.
23. Le Minor, L., Coynault, C., Chabbert, Y.A., Gerbaud, G., Le Minor, S. Compatibility groups of metabolic plasmids. *Ann. microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1976, B127, 31-40.
24. Петровская В.Г., Измаилов Ф.Н. Генетическая характеристика детерминанта, контролирующего способность фер-

- ментировать сахарозу у атипичных штаммов *S. newport*.
Вестн. АМН СССР, 1976, 64-69.
25. Sekijima, Y., Iseki, S. On the r^+ antigens of bacteria having drug resistance transfer factor R. Proc. Japan Acad., 1966, 42, 984-988.
 25. Orskov, I., Orskov, F. Episome carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. I. Transmission of the determinant of the K88 and influence of the transfer of chromosomal markers. J. Bacteriol., 1966, 91, 69-75.
 27. Ishibashi, M. F pilus as f^+ antigen. J. Bacteriol., 1967, 93, 379-389.
 28. Meynell, G.G., Lawn, A.M. Filamentous phages specific for the I sex factor. Nature, 1968, 217, 1184-1186.
 29. Bukhari, A.I. Bacteriophage Mu as a transposition element. Ann. Rev. Genet., 1976, 10, 389-412.
 30. Berg, D.E. Mutations resulting from Tn5 insertion into the chromosome of *E. coli*. EMBO Workshop. In: Plasmids and other extrachromosomal genetic elements. W. Berlin, 1978, 9.
 31. McPhee, D.G. Effect of rec mutations on the ultraviolet protecting and mutation-enhancing properties of the plasmid R-Utrecht in *Salmonella typhimurium*. Mutat. Res., 1973, 19, 367-370.
 32. McCann, J., Spingam, N.E., Kobori, J., Ames, B.N. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tests strains with R factor plasmids. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1975, 72, 979-983.
 33. Baumberg, S., Dennison, S. Variation in expression of sex factor genes in the *Proteus-Providencia* group relative to *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 1975, 123, 278-286.
 34. Meynell, E., Meynell, G.G., Datta, N. Phylogenetic relationships of drug-resistance factors and other transmissible plasmids. Bacteriol. Rev., 1968, 52, 51-83.
 35. Хейнару А.Л., Илус Т. О чувствительности к акрифлавину R^+ и R^- штаммов бактерий и элиминация R-факторов. Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, 1976, 383, 95-116.

Changes in biological characters of the strains
of enterobacteria by transmissible R- and Col-
plasmids

E.T. Tallmeister, O.P. Laidus, A.L. Heinaru

S u m m a r y

Some alterations in various biological characters of the strains of *E. coli* and *Sh. flexneri* were noticed after they had received fin^+ and fin^- R-plasmids together with ColIb-plasmids from the strains of *Salmonella heidelberg* A16¹. The R^+ColIb plasmids completely inhibited the activity of the enzyme of the conversion of β -phenylpropionic acid as well as the production of the type I fimbriae. The R^+ColIb bacteria appeared to be sucrose or maltose negative and became auxotrophic to methionine. In addition some changes in the antigenic properties of the bacteria were discovered.

In the case of fin^- R-plasmids the R^+ColIb plasmid complex was unstable.

It is recommended to study the possible occurrence of various plasmids in atypical strains of enterobacteria to avoid mistakes in the identification of bacteria.

О ВОЗМОЖНОЙ РОЛИ ЭКСТРАХРОМОСОМНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В АДАПТАЦИИ И В ЭВОЛЮЦИИ

А.Л. Хейнару

Одной из основ теории эволюции является генетика, в частности, новейшие данные молекулярной биологии и молекулярной генетики. Для понимания процессов макро- и микроэволюции надо знать процессы, происходящие на молекулярном уровне (т.н. молекулярной эволюции). Генетические закономерности процесса эволюции, несомненно, служат фундаментом для исследования всех других его механизмов, потому что эволюционный процесс действительно имеет генетическую основу.

Известно, что в природе, кроме обмена наследственной информацией при половом процессе, существует ряд других каналов информационного обмена между организмами, при которых таксономические ограничения могут в той или иной степени сниматься. То, что известно сегодня об информационном обмене, позволяет взглянуть на эволюцию с информационных позиций. С этой точки зрения, знаменитую дарвиновскую триаду — наследственность, изменчивость и естественный отбор — на уровне первичных механизмов, можно свести к информационным показателям /1/. В данной статье попытаемся представить некоторые спорные вопросы микро- и макроэволюции с точки зрения молекулярной генетики, акцентируя внимание на роли экстрахромосомных элементов в адаптации и в эволюции.

Все метаболические процессы организма катализируются ферментами. Известно, что естественный отбор осуществляется на уровне фенотипов. Следовательно, отбору подвергается трехмерная структура полипептида /2/. Из этого вытекает, что изменчивость как материал эволюции проявляется в структуре белков. Она может осуществляться за счет изменения генетической структуры популяции, что, в свою очередь, является результатом мутирования генов, т.е. ДНК. Однако необходимо подчеркнуть, что 99,9 и более процентов из числа новых мутаций являются вредными для организма как целого, и не должны иметь селективного преимущества, вследствие чего они не могут на-

накапливаться в популяциях. Из этого вытекает вопрос, действительно ли происходит накопление новых мутаций в популяциях.

Выяснено, что многие функционально разные белки (трипсин и кимотрипсин, мюглобин и гемоглобин, L- и H-цепи иммуноглобулинов) возникли в результате генетической изменчивости соответствующих дубликатных генов /3/. Поэтому можно предполагать, что последние и являются материалом для накопления генотипической изменчивости в генофонде организмов без понижения эволюционного значения самого организма /4-5/. Исходя из этого дубликация генов и последовательное их мутирование являются классическим объяснением эволюции на молекулярном уровне /6/. Ясно, что в настоящее время такое одностороннее объяснение процесса эволюции на молекулярном уровне не может исчерпывать весь процесс.

Общепринято, что основой для генотипической изменчивости являются генные мутации. Эти мутации определяют в процессе трансляции возникновение новых форм структурных белков и ферментов, а также разных форм рибонуклеиновых кислот (*m*РНК, *t*РНК, *r*РНК), участвующих в этом процессе. Далеко не все мутационные события в ДНК, хотя и могут быть транскрибированы в процессе транскрипции, образуют функциональные единицы для процесса трансляции в связи с изменениями или неспособностью образовать вторичные структуры РНК в посттранскрипционном процессинге. Следовательно, даже генетические молекулы имеют свои "фенотипы", которые починаются селективному давлению /7/. Поэтому нуклеотидная последовательность генов (ДНК) может иметь компромисс между потребностью к образованию вторичной структуры РНК и соответствующего белка, которые она кодирует /8/. Исходя из вышесказанного, с точки зрения второго подхода к объяснению эволюции на молекулярном уровне, для эволюции необязательны новые белки (и соответствующие новые аллели и дубликатные гены), причем фенотипическая изменчивость осуществляется, в основном, на уровне генетического контроля структурных генов /9-10/. Действительно оказалось, что степень накопления мутаций в структурных генах не коррелировала со степенью анатомической эволюции у высших млекопитающих /11/. Так, после сравнения 44 белков шимпанзе, выполняю-

щих гомологические функции, выяснилось, что в 99% случаев они были идентичны /12/. Итак, структурные гены для этих белков почти идентичны и в процессе эволюции не происходило накопления мутаций /13/.

Чтобы понять сущность молекулярной эволюции, следует остановиться более подробно на вопросе мутационного давления в процессе эволюции.

Сторонники неодадарвинистского подхода к эволюции считают, что уровень и направление эволюции определяются положительным селективным давлением. Новейшие данные по изучению аминокислотной последовательности белков и полиморфизма ферментов позволили им выдвинуть предположение, что многие мутации являются селективно нейтральными и что эволюция может происходить, по крайней мере, в некоторых случаях за счет фиксации этих нейтральных мутаций /14-17/. Нейтралисты выдвинули роль случайных событий в эволюции /18-19/. Случайную природу нейтральных мутаций они связывали с теорией эволюции в связи с синонимными кодонами, которые способствуют сведению к минимуму фенотипического эффекта генетических повреждений /20-21/. Однако маловероятно, что эволюция происходит только на основе случайных мутаций, хотя, вероятно, их роль в адаптации организмов невозможно отрицать. Селекционисты неоднократно вступали в полемику с нейтралистами /22-23/. Было показано, что эволюцию белков в группе глобинов /24/ и инсулина /25/ можно объяснить на основе адаптивного давления.

Никакая система информации не может быть на 100% эффективной /26/. В каждом процессе передачи генетической информации возникает шум, представляющий собой в данном случае биохимическое выражение второго закона термодинамики /27/. Подсчитано, что частота спонтанных мутаций типа всевозможных транзиций должна быть $1,3 \times 10^{-2}$ ошибок в генерации на одно азотистое основание /28/. С другой стороны, в экспериментах *in vivo* уровень мутаций при синтезе ДНК находится обыкновенно в пределах 10^{-9} /16/. Такое невероятное уменьшение частоты мутаций происходит благодаря процессу репарации /29/.

Согласно принципу Шаннона /26/ шум можно уменьшить, но его невозможно элиминировать полностью. Возникшие в струк-

турных генах спонтанные мутации можно рассматривать как энтропные /6/. С другой стороны, у микроорганизмов и вирусов хорошо доказано наличие антимутаторных /30/ и мутаторных /31/ локусов. Мутантные полимеразы и сходные с ними ферменты влияют не только на уровень, но и на специфичность мутаций и поэтому такие мутации не могут быть полностью энтропными. Их называют модулированными мутациями и, по некоторым данным, 99,9% нейтральных мутаций относятся к типу модулированных /6/.

Не меньший эффект на изменчивость организмов оказывает рекомбинационный процесс, уровень которого определен генотипом. Эволюция на основе рекомбинационной изменчивости является сравнительно эффективной, так как соответствующие нуклеиновые кислоты уже заранее экспонированы к естественному отбору /6, 32-33/. Рекомбинационный уровень, как и мутационный, подчиняется селективному давлению, открытому и у высших организмов /34-35/. Особо надо подчеркнуть регуляцию рекомбинационного процесса у организмов, что может привести к уменьшению или повышению новой изменчивости /34/.

Третий подход к молекулярной эволюции базируется на рекомбинационном процессе, который осуществляется с помощью экстрахромосомных элементов - плазмид и вирусов - как у эукариотов /6, 32-37/, так и у прокариотов /6, 38-42/. Адаптивная роль экстрахромосомных элементов доказана во многих стрессовых ситуациях /43/.

Роль плазмид и вирусов (фагов) очень хорошо доказана в случае прокариотов. Доказано присутствие экстрахромосомной ДНК в бактериальных клетках в природных условиях до 100% случаев /44-46/. Плазмиды вирусы способны передавать, кроме собственных генов, и хромосомные гены хозяина в другую клетку. Например, плазида лекарственной устойчивости RP4 передается всем энтеробактериям, а также другим свободноживущим бактериям /47-51/. Количество ДНК в клетках, передаваемое с помощью экстрахромосомных элементов, может быть даже выше количества ДНК в хромосоме этих клеток /45/. Найдены дефектные фаги (вирусы), способные передавать хромосомные гены и являющиеся поэтому типичными плазмидами /52-53/.

Перекомбинацию генетической информации с помощью экстрахромосомных элементов можно назвать природной генетической инженерией. Выяснено, что кроме обыкновенной интра- и интерхромосомной генетической рекомбинации в природе происходит т. н. незаконная рекомбинация /54/. Вероятно, у всех экстрахромосомных элементов и в хромосомах имеются специфические инвертированные последовательности (или IS-элементы), с помощью которых происходит рекомбинация между ДНК-ами, не имеющими никакой остальной гомологии /55-59/. С помощью IS-последовательностей рекомбинируются специфические гены или целые блоки генов, называемые транспозонами /60-63/. Такая незаконная рекомбинация может привести к амплификации (дубликации) участка ДНК, определяющего какое-либо специфическое преимущество организма /36/. Хотя рестрикционные эндонуклеазы связываются обыкновенно с защитными механизмами организма против чужеродной ДНК, разрушая ее, они могут играть важную роль и при рекомбинации самих экстрахромосомных элементов, особенно если они определены самими этими внехромосомными элементами /64-67/. Многие рестрикционные эндонуклеазы узнают специфические симметричные инвертированные последовательности ДНК. Сходные симметричные элементы или палиндромы встречаются, в основном, в регуляторных областях ДНК и найдены у многих про- и эукариотов /68-69/.

Экспериментальные данные показывают, что плазмиды и вирусы могут служить переносчиками всевозможных генов. В то же время экстрахромосомные элементы определяют быструю эволюцию, по крайней мере, среди бактерий и быстрое распределение этих бактерий, если имеются соответствующие селективные преимущества. Описаны, например, R-плазмиды, определяющие резистентность к новым, синтетическим антибиотикам /70-71/, плазмиды биодegradации разных фенольных и других химических соединений /72-78/, в том числе и плазмиды, разлагающие пестициды 2,4-Д /79/, а также многие другие типы плазмид.

Хорошо известно, что в эукариотических клетках могут присутствовать разнообразные вирусы и другие плазмидообразные ДНК (митохондриальная ДНК, пластидная ДНК и др.). Интересным является факт, что у грибов имеются типичные плазмиды

/80/. Недавно выяснилось, что у высших растений присутствует гетерогенная популяция митохондриальной ДНК /81/. Для вирусов растений характерно то, что они могут инфицировать очень широкий круг разных видов /82-83/. Исследование эволюции некоторых соединений у растений показало вероятную вирусную передачу соответствующих генов /84-86/. Показана и возможная роль вирусов в эволюции скелета и биохимических признаков у животных /87-89/. Молекулярно-биологические исследования показали возможность транскрипции и трансляции прокариотической ДНК в клетках животных и растений /90-92/, а также *vice versa* /93-95/. Из вышеприведенных фактов следует, что вирусы и плазмиды могут передавать новые гены в клетках эукариотов. Этот тип передачи генетической информации является весьма существенным для объяснения эволюции эукариотов, так как при половом процессе и в мутационном процессе невозможно возникновение новых генов. Возможно, что вирусы и плазмиды играют важную роль и в процессе индивидуального развития и в адаптации у высших организмов.

Предложены разные гипотезы для объяснения роли онкогенных РНК-вирусов в эмбриональном развитии высших животных /37, 42, 89, 96-100/. Выяснилось, что при дроблении в стадии 2-8 клеток освобождаются онкогенные РНК-вирусы, причем этот процесс генетически детерминирован /101/. Характерно, что эти вирусы часто обнаруживаются в плаценте /102-103/. Имеются данные, показывающие, что именно РНК-вирусы являются как переносчиками генетической информации, так и факторами эволюции /104-105/, и играют важную роль в регуляторных процессах у животных /11/. Опыты по гибридизации показали, что высокоповторяемая ДНК у животных по нуклеотидному составу очень сходна с РНК вирусов животных /89, 98, 106-107/. Исходя из вышеизложенного можно заключить, что гены, кодирующие белки эндогенных вирусов, обнаруживаются в хромосомной ДНК нормальных клеток и что при нормальном развитии высших организмов (в онтогенезе) есть периоды, когда происходит экспрессия всего провируса или его отдельных генов.

Эндогенные вирусы разных видов животных различаются между собой. В то же время на основе исследования гомологии ну-

кислот вирусов с ДНК разных животных выяснилось, что эндогенные вирусы (провирусы) разных видов животных могут обнаруживать сходство, пропорциональное филогенетическому родству животных - хозяев этих вирусов /108/. Другими словами, генеалогическое дерево эндогенных вирусов при ближайшем рассмотрении соответствует генеалогическому дереву птиц и млекопитающих /105, 109-110/. Следовательно, эндогенные вирусы являются результатом эволюции нормальной клетки. Имеются данные, позволяющие рассматривать наружные белки вируса как нормальные компоненты клеточной мембраны /108/. Поэтому более вероятно, что эндогенные онкогенные вирусы являются не результатом, а причиной быстрой анатомической эволюции /11/. Все эти вышеприведенные факты говорят в пользу существенной роли экстрахромосомных элементов в эволюции и в адаптации эукариотов.

Итак, можно заключить, что экстрахромосомные элементы могут играть важнейшую роль в процессе эволюции организмов. Их роль в процессе эволюции и при индивидуальном развитии прокариотов хорошо доказана. Доказательств в пользу возможной роли экстрахромосомных элементов при передаче новой генетической информации среди эукариотов и при их эволюции еще мало. Но, вероятно, что роль экстрахромосомных элементов у эукариотов связана главным образом с процессом индивидуального развития этих организмов. Если это так, то экстрахромосомные элементы являются носителями генетической пластичности организмов, через которую осуществляется большинство адаптивных процессов. В том случае экстрахромосомные элементы должны занимать одно из центральных мест в эволюционной биологии, что и можно ожидать в ближайшем будущем.

Л и т е р а т у р а

1. Кордям В.А. Перенос информации в биосфере и возможное эволюционное значение этого процесса. Усп.совр.биол., 1976, 81, 51-67.
2. Dickerson, R.E. Molecular evolution. In: Life on Earth,

- H.O. Wilson et al. (ed.). Sinauer Associates Inc., Stanford, Conn., 1973.
3. Yourna, J., Kohno, T., Roth, R. Enzyme evolution generation of a bifunctional enzyme by fusion of adjacent genes. *Nature*, 1970, 228, 820-824.
 4. Ohno, S. Evolution by gene duplication. George Allen & Unwin Ltd, London, 1970.
 5. Hansche, P.E. Gene duplication as a mechanism of genetic adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1975, 79, 661-674.
 6. Reaney, D. Extrachromosomal elements as possible of adaptation and development. *Bacteriol. Rev.*, 1976, 40, 552-590.
 7. Mills, D.R., Kramer, F.R., Spiegelman, S. Complete nucleotide sequence of a replicating RNA molecule. *Science*, 1973, 180, 916-927.
 8. Min Jou, W., Haegeman, G., Ysebaert, M., Fiers, W. Nucleotide sequence of the gene coding for bacteriophage MS2 coat protein. *Nature*, 1972, 237, 82-88.
 9. Britten, R.J., Davidson, E.H. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science*, 1969, 165, 349-357.
 10. Davidson, E.H., Britten, R.J. Organisation, transcription, and regulation in the animal genome. *Quant. Rev. Biol.*, 1973, 48, 565-613.
 11. Wilson, A.C., Mañon, L.R., Sarich, V.M. Two types of molecular evolution: evidence from studies of interspecific hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1974, 71, 3843-2847.
 12. King, M.C., Wilson, A.C. Evolution of two levels in humans and chimpanzees. *Science*, 1975, 188, 107-116.
 13. Kolata, G.B. Evolution of DNA: changes in gene regulation. *Science*, 1975, 189, 446-447.
 14. Kimura, M. The rate of molecular evolution considered from the stand point of population genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1969, 63, 1181-1188.
 15. King, M.C., Jukes, T.H. Non-Darwinian evolution. *Science*, 1969, 164, 788-798.

16. Kimura, M., Ohta, T. Mutation and evolution at the molecular level. *Genetics*, 1973, 73 (Suppl.), 19-40.
17. Ohta, T. Mutation pressure as the main cause of molecular evolution and polymorphism. *Nature*, 1974, 252, 351-354.
18. Monod, J. *Chance and necessity*. Collins, London, 1970.
19. Ohta, T. Slightly deleterious mutant substitution in evolution. *Nature*, 1973, 246, 96-98.
20. Crick, F.H.C. Origin of the genetic code. *J.Mol. Biol.*, 1968, 38, 367-379.
21. Alff-Streinberger, C. The genetic code and error transmission. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 1969, 64, 584-591.
22. Lanks, K.W., Kitchin, F.S. Conservative mutations in homologous proteins. *Nature*, 1970, 226, 753-754.
23. Richmond, R.C. Non-Darwinian evolution: a critique. *Nature*, 1970, 225, 1025-1028.
24. Goodman, M., Moore, G.W., Matsuda, G. Darwinian evolution in the genealogy of haemoglobin. *Nature*, 1975, 253, 603-608.
25. Blundell, T.L., Wood, S.P. Is the evolution of insulin Darwinian or due to selectively neutral mutation? *Nature*, 1975, 257, 197-203.
26. Shannon, C.E. The mathematical theory of communication. In: *The mathematical Theory of Communication*. C.E. Shannon, W. Weaver (ed.), University of Illinois Press, Urbana, Illinois, 1949.
27. Gatlin, L. *Information theory and the living system*. Columbia University Press, New York, 1972.
28. Koch, A.L., Miller, C. A mechanism for keeping mutation in check. *J. Theor. Biol.*, 1965, 8, 71-80.
29. Hopfield, J.J. Kinetic proof-reading: a new mechanism for reading errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1974, 71, 4135-4139.
30. Muzyczka, N., Poland, R.L., Bessman, M.J. Studies on the biochemical basis of spontaneous mutation. I. A comparison of the DNA polymerases of mutator, antimu-

- tator and wild-type strains of bacteriophage T4. J. Biol. Chem., 1972, 247, 7116-7122.
31. Hoess, R.H., Herman, R.K. Isolation and characterization of mutator strains of Escherichia coli. J. Bacteriol., 1975, 122, 474-484.
 32. Reaney, D.C. Viruses and evolution. Int. Rev. Cytol., 1974, 37, 21-52.
 33. Zhdanov, V.M., Tikchonenko, T.I. Viruses as a factor of evolution: exchange of genetic information in the biosphere. Adv. Virus. Res., 1974, 19, 361-395.
 34. Pandey, K.K. Origin of genetic recombination: regulation of genetic recombination in higher organisms - a theory. J. Theor. Appl. Genet., 1972, 42, 250-261.
 35. Dewees, A.A. Genetic modification of recombination rate in *Thibolium castaneum*. Genetics, 1975, 81, 537-552.
 36. Szybalski, W., Szybalski, E.H. Visualization of the evolution of viral genomes, p. 563-580. In: Viruses, Evolution and Cancer, E. Kurstak, K. Maramorosch (ed.), Academic Press Inc., New York, 1974.
 37. Reaney, D.C. A regulatory role for viral RNA in eukaryotes. J. Theor. Biol., 1975, 49, 461-492.
 38. Anderson, E.S. Possible importance of transfer factors in bacterial evolution. Nature, 1966, 209, 637-638.
 39. Anderson, E.S. The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. Annu. Rev. Microbiol., 1968, 22, 131-180.
 40. Anderson, E.S. The evolutionary significance of virus infection. Nature, 1970, 227, 1346-1347.
 41. West, D.A. Does virus infection have evolutionary significance. Nature, 1971, 229, 637.
 42. Reaney, D.C. On the origin of prokaryotes. J. Theor. Biol., 1974, 48, 243-251.
 43. Meynell, E., Meynell, G.G., Datta, N. Phylogenetic relationships of drug-resistant factors and other transmissible bacterial plasmids. Bacteriol. Rev., 1968, 32, 55-82.
 44. Gyles, C., So, M., Falkow, S. The enterotoxin plasmids

- of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 1974, 130, 40-49.
45. Novick, R.P. Bacterial plasmids, p. 537-586. In: *Handbook of Microbiology*, vol. IV, A.L. Laskin, H.A. Lechevalier (ed.), CRC Press, Cleveland, Ohio, 1974.
 46. Holloway, B.W., Krishnapillai, V. Bacteriophages and bacteriocins, p. 99-132. In: *Genetics and Biochemistry of Pseudomonas*. P. Clarke, M. Richmond (ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York, 1975.
 47. Sykes, R.B., Richmond, R.H. Intergeneric transfer of a β -lactamase gene between *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Nature*, 1970, 226, 952-954.
 48. Datta, N., Hedges, R.W., Shaw, E.J., Sykes, R.B., Richmond, M.H. Properties and R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 1971, 108, 1244-1249.
 49. Datta, N. Hedges, R.W. Host ranges of R factors. *J. Gen. Microbiol.*, 1972, 70, 453-460.
 50. Olsen, R.H., Shipley, P. Host range and properties of the *Pseudomonas aeruginosa* R factor R1822. *J. Bacteriol.*, 1973, 113, 772-780.
 51. Jacob, A.E., Grinter, N.J. Plasmid RP4 as a vector replicon in genetic engineering. *Nature*, 1975, 255, 504-505.
 52. Chakrabarty, A.M., Gunsalus, I.C. Defective phage and chromosome mobilization in *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1969, 64, 1217-1223.
 53. Mukai, T., Matsubara, K. Conjugal transfer of plasmid *dv*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 77, 818-823.
 54. Franklin, N.C. Illegitimate recombination, p. 175-194. In: *The Bacteriophage Lambda*. A.D. Hershey (ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1971.
 55. Richmond, M.H., Wiedeman, B. Plasmids and bacterial evolution, p. 59-85. In: *Evolution in the microbial World*. Soc. Gen. Microbiol. Symp., vol. 24. Cambridge University Press, Cambridge, 1974.
 56. Hu, S., Ohtsubo, E., Davidson, N. Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plas-

- mids of *Escherichia coli*: structure of F13 and related F-primes. *J. Bacteriol.*, 1975, 122, 749-763.
57. Hu, S., Ohtsubo, E., Davidson, N., Saedler, H. Electron microscope heteroduplex studies of sequence relationships among bacterial plasmids. XII. Identification and mapping of the insertion sequences IS1 and IS2 in F and R plasmids. *J. Bacteriol.*, 1975, 122, 764-775.
 58. Hu, S., Ptashne, K., Cohen, S.N., Davidson, N. A B set of F is IS3. *J. Bacteriol.*, 1975, 123, 687-692.
 59. Ptashne, K., Cohen, S.N. Occurrence of insertion (IS) regions on plasmid deoxyribonucleic acid as direct and inverted nucleotide sequence duplications. *J. Bacteriol.*, 1975, 122, 776-781.
 60. Hedges, R.W., Jacob, A.E. Transportation of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Mol. Gen. Genet.*, 1974, 132, 31-40.
 61. Klecker, N., Chan, R.K., Tye, B.K., Bolstein, D. Mutagenesis by insertion of a drug-resistance element carrying an inverted repetition. *J. Mol. Biol.*, 1975, 97, 561-575.
 62. Berg, D.E., Davies, J., Allet, B., Rochaix, J.D. Transposition of R factor genes to bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975, 72, 3628-3632.
 63. Hedges, R.W., Jacob, A.E., Datta, N., Coetzee, J.N. Properties of plasmids produced by recombination between R factor of group FI and FII. *Mol. Gen. Genet.*, 1975, 140, 289-302.
 64. Meselson, M., Yuan, R. DNA restriction enzyme from *Escherichia coli*. *Nature*, 1968, 217, 1110-1114.
 65. Hedgpeth, J., Goodman, H.M., Boyer, H.W. DNA nucleotide sequence restricted by the R1 endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1972, 69, 3448-3452.
 66. Meselson, M., Yuan, R., Heywood, J. Restriction and modification of DNA. *Annu. Rev. Biochem.*, 1972, 41, 447-466.
 67. Arber, W. DNA modification and restriction. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1974, 14, 1-37.

68. Gilbert, W., Maxam, W. The nucleotide sequence of the Lac operon. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1973, 70, 3581-3585.
69. Wilson, D.A., Thomas, C.A., Jr. Palindromes in chromosomes. J. Mol. Biol., 1974, 84, 115-144.
70. Campell, A.M. Episomes in evolution, p. 534-561. In: Evolution of genetic systems. H.H. Smith (ed.). Gordon and Breach, New York, 1973.
71. Benveniste, R., Davies, J. Aminoglycoside antibiotic inactivating enzymes in Actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic resistant bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1973, 70, 2276-2280.
72. Chakrabarty, A.M. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in Pseudomonas. J. Bacteriol., 1972, 112, 815-823.
73. Dunn, N.W., Gunsalus, I.C. Transmissible plasmids coding early enzyme of naphthalene oxidation in Pseudomonas putida. J. Bacteriol., 1973, 114, 974-979.
74. Rheinwald, J.G., Chakrabarty, A.M., Gunsalus, I.C. A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in Pseudomonas putida. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1973, 70, 885-889.
75. Wong, C.L., Dunn, N.W. Transmissible plasmid coding for the degradation of benzoate and m-toluate in Pseudomonas arvilla mt-2. Genet. Res., 1974, 23, 227-232.
76. Williams, P.A., Murray, K. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by Pseudomonas putida (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. J. Bacteriol., 1974, 120, 416-423.
77. Nieder, M., Shapiro, J. Physiological function of the Pseudomonas putida PpG6 (Pseudomonas oleovorans) alkane hydroxylase: monoterminial oxidation of alkanes and fatty acids. J. Bacteriol., 1975, 122, 93-98.
78. Chakrabarty, A.M. Plasmids in Pseudomonas. Annu. Rev. Genet., 1976, 10, 7-30.
79. Pemberton, J.M., Fisher, P.R. 2,4-D plasmids and persis-

- tence. *Nature*, 1977, 268, 732-733.
80. Guerineau, M.P., Solonimski, P., Avner, P.R. Yeast episome: oligomycin resistance associated with a small covalently closed non-mitochondrial circular DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 61, 462-469.
 81. Quétier, F., Vedel, F. Heterogeneous population of mitochondrial DNA molecules in higher plants. *Nature*, 1977, 268, 365-367.
 82. Crill, P., Hagedorn, D.J., Hanson, E.W. Alfalfa mosaic, the disease and its incitant. *W.D. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.*, 1970, No. 280.
 83. Smith, K.M. A textbook of plant virus diseases. Longman London, 1972.
 84. Harbourne, J.B. The evolution of flavonoid pigments in plants, p. 271-297. In: *Comparative Phytochemistry*. T. Swain (ed.), Academic Press Inc., New York, 1966.
 85. Bate-Smith, E.C., Swain, T. The asperulosides and the aucobins, p. 159-174. In: *Comparative Phytochemistry*. T. Swain (ed.), Academic Press Inc., New York, 1966.
 86. Went, F.W. Parallel evolution. *Taxon*, 1971, 20, 197-226.
 87. Mourant, A.E. Transduction and skeletal evolution. *Nature*, 1971, 231, 466-467.
 88. Aposhian, H.V., Quasba, P.K., Telton, D.B., Pletsch, A., Sethi, V.S. The polyoma pseudovirion - its properties, production and use in transferring DNA to mouse and human cells. In: *Cellular Modification and Genetic Transformation by exogenous Nucleic Acids*. R.F. Beers, R.C. Tilgham (ed.), The John Hopkins University Press, Baltimore, 1973.
 89. Temin, H.M. On the origin of RNA tumor viruses. *Annu. Rev. Genet.*, 1974, 8, 155-177.
 90. Merrill, C.R. Bacteriophage interactions with higher organisms. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 1974, Ser. II, 36, 265-272.
 91. Sinsheimer, R.L. Recombinant DNA. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, Calif., 1977, 46, 415-438.
 92. Blaschek, W., Hess, D. Transcription of bacterial DNA by isolated plant nuclei. *Experientia*, 1977, 33, 1594-1595.

93. Morrow, J.F., Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W., Goodman, H.M., Helling, R.B. Replication and transcription of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1974, 71, 1743-1747.
94. Murray, K. Biochemical manipulation of genes. *Endeavour*, 1976, 35, 129-133.
95. Georgiev, G.P., Ilyin, Yu.V., Ryskov, A.P., Tchurikov, N.A., Yenikolopov, G.N. Isolation of eukaryotic DNA fragments containing structural genes and the adjacent sequences. *Science*, 1977, 195, 394-397.
96. Huebner, R.J., Todaro, G. The oncogene hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1969, 64, 1087-1091.
97. Huebner, R.J., Kelloff, G.J., Sarma, P.S., Lane, W.T., Turner, H.C., Gilden, R.V., Oroszlan, S., Meier, H., Myers, D., Peters, R.L. Group specific antigen expression during embryogenesis of the genome of the C-type RNA tumor viruses: implications for ontogenesis and oncogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1970, 67, 366-376.
98. Gillespie, D., Gallo, R.C. RNA processing and RNA tumor virus origin and evolution. *Science*, 1975, 188, 802-811.
99. Weiss, R. Molecular analysis of the oncogene. *Nature*, 1976, 260, 93.
100. Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Vogt, P.K. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA. *Nature*, 1976, 260, 170-173.
101. Solter, D., Biczysko, W., Koprowski, H. Host-virus relationship at the embryonic level, p. 3-30. In: *Viruses, Evolution and Cancer*, E. Kurstak, K. Maramorosch (ed.). Academic Press Inc., New York, 1974.
102. Kalter, S.S., Helmke, R.J., Heberling, R.L., Pangiel, M., Fowler, A.K., Stickland, J.E., Hellman, A. C-type particles in normal human placentas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1973, 50, 1081-1084.
103. Hsiung, G.D., Fong, C.K.Y., Evans, C.H. Prevalence of

- endogenous oncornavirus in guinea pigs. *Intervirology*, 1974, 2, 319-331.
104. Todaro, G.J. Evolution and modes of transmission of RNA tumor viruses. *Am. J. Pathol.*, 1975, 81, 590-605.
 105. Benveniste, R., Todaro, G.J. Evolution of C viral genes: preservation of ancestral murine type C viral sequences in pig cellular DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975, 72, 4090-4095.
 106. Gillespie, D., Gallo, R.C. Hybridization of tumor virus RNA to DNA from cells. *3rd Int. Congr. Virol.*, Abstr. W41, p. 137, 1975.
 107. Wong-Staal, F., Gallo, R.C., Gillespie, D. Genetic relationship of a primate RNA tumor virus genome to genes in normal mice. *Nature*, 1975, 256, 670-672.
 108. Агол В.И. Эндогенные вирусы. *Усп. совр. биол.*, 1976, 82, 163-180.
 109. Benveniste, R., Todaro, G.J. Evolution of C-type viral genes: inheritance of exogenously acquired viral genes. *Nature*, 1974, 252, 456-459.
 110. Lieberg, M.M., Sherr, C.J., Todaro, G.J., Benveniste, R.E., Callahan, R., Coon, H.G. Isolation from the Asian mouse *Mus caroli* of an endogenous type C virus related to infectious primate type C viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975, 72, 2315-2319.

On a possible role of extrachromosomal
elements in adaption and evolution

A.L. Heinaru

S u m m a r y

Some debatable points of micro- and macroevolution on the basis of molecular biology, mainly according to the data for the possible role of extrachromosomal elements in adaptation and evolution were reviewed. It is concluded that plasmids and viruses have an important role in the evolution of pro- and eukaryotes. The possible role of extrachromosomal elements in eukaryotes is mainly connected with the process of individual development of these organisms.

О R-, Col- И Hly-ПЛАЗМИДАХ У ШТАММОВ
БАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ПОРОСЯТ

А.Л. Хейнару, Р. Кирх, Э.Т. Таллмейстер

Для увеличения продуктов животноводства в качестве стимуляторов роста животных, а также в профилактических целях широко используются антибиотики /1-3/. Применение антибиотиков тетрациклинового и неомицинового ряда в животноводстве способствует селекции и распространению резистентных к этим антибиотикам штаммов энтеробактерий и повышает вероятность трансмиссии штаммов с плазмидами множественной резистентности к антибиотикам (R-плазмиды) от внешней среды и от животных к людям /4-9/.

В литературе, однако, имеются данные, что R-плазмиды у штаммов бактерий, изолированных от людей, отличаются от R-плазмид, происходящих от штаммов бактерий, изолированных от животных. В последнем случае R-плазмиды характеризуются гетерогенностью и лабильностью /10-11/, монорезистентностью к тетрациклину /11-12/ и температурочувствительной передачей в процессе конъюгации /11, 13-14/. Хотя в экспериментальных опытах доказана передача R-плазмид *in vivo* /15-16/, нет прямых доказательств, что этот процесс действительно происходит в естественных условиях /17-18/.

Кроме R-плазмид, у животных выявлено наличие разных плазмид вирулентности /19-20/. Сюда относятся Hly-плазмиды, детерминирующие продукцию α - и B-гемолизина /21-25/, Ent-плазмиды, определяющие продукцию термостабильных и термолабильных (EntST; EntST + LT) энтеротоксинов /26-29/, плазмиды, кодирующие K-антигены бактерий - K88-плазмиды /30-32/, K99-плазмиды /33-34/.

В нашей стране опубликованы лишь некоторые данные по изучению R- и Col-плазмид и по плазмидам вирулентности у штаммов бактерий, изолированных от животных /3, 22-23, 35/. Около десяти лет назад нами были проведены небольшие исследования по R- и Col-плазмидам у штаммов *E. coli*, изолированных от поросят и телят /36-39/.

В связи с тем, что до сих пор у нас проводилось еще

очень мало работ по изучению плазмид у бактерий, выделенных от сельскохозяйственных животных, задачей настоящей работы являлось изучение лекарственной устойчивости и наличие трансмиссивных R-, Col- и H₁-плазмид у штаммов энтеробактерий, изолированных от поросят.

Материал и методика

Среды. Использовали мясопептонный бульон Хоттингера, рН 7,4 и плотные питательные среды: 0,5 и 1,5%-ный мясопептонный агар, среду Эндо, кровяной агар /40/, среду SGC /41/ и минимальный агар Дэвиса и Мингиоли /42/. Антибиотики хлорамфеникол, тетрациклин и стрептомицин добавляли к средам в концентрации 25 мкг/мл, неомицин - 20 мкг/мл, бензилпенициллин - 1000 ЕД/мл и налидиксимовую кислоту - 20 или 50 мкг/мл. Определение чувствительности к неомицину проводилось в бессолевой среде /43/.

Штаммы. В работе использовали 240 штаммов *E. coli*, выделенных от больных поросят, и 10 штаммов грамотрицательных лактозонегативных штаммов бактерий, изолированных от поверхностей окон и дверей. Все штаммы бактерий были изолированы на экспериментальном свинокомбинате Показательного совхоза-техникума им. Ю. Гагарина Вильяндского района ЭССР в конце 1975 и начале 1976 годов.

В процессе конъюгации при изучении передачи R-плазмид в качестве чувствительного к антибиотикам бактерии-реципиента использовали стандартный штамм *E. coli* K12 J6-2 R⁻, Col⁻, R⁻, pro, his, trp, lac, nal-r. Штаммом-индикатором для определения колициногенности являлись штаммы *E. coli* K12 J6-2 и P678 thr, leu, B₁, str-r. При передаче Col-плазмид в процессе конъюгации штаммом-реципиентом являлся местный штамм *E. coli* 17 Col⁻str-r, а при передаче H₁-плазмид - местный штамм *E. coli* 14 nal-r, имеющий хромосомные маркеры резистентности к антибиотикам и изолированный от поросят.

Лекарственные вещества. Использовались советские препараты: стрептомицин сульфат, кристаллическая натриевая соль

пенициллина, тетрациклин гидрохлорид, неомицин сульфат и хлорамфеникол. Применялся препарат налидиксиновой кислоты фирмы "Sigma".

Методы. Для проверки чувствительности к лекарственным веществам бульонные культуры исследуемых бактерий со средним содержанием 5×10^8 микробных тел в 1 мл разбавляли до 10^{-4} фосфатным буфером (рН 6,5 ... 6,7) и засевали со стандартной петлей на мясопептонный агар с содержанием лекарственных веществ различной концентрации /38/.

Колициногенность и чувствительность к колицинам определяли по общепринятой методике /44/.

Гемолитическая активность бактерий определялась по Колякову /40/.

Передачу R-плазмид в процессе конъюгации проводили по системе LFT (low frequency of transfer). В 4 мл бульона засевали бульонные культуры донора (0,1 мл) и реципиента (0,9 мл) в логарифмической фазе роста. После инкубирования в течение 4 часов при 37° и параллельно при 25° разные разведения засевали в чашки Петри с мясопептонным агаром для определения числа клеток доноров и рекомбинантов. Селективная среда для выявления рекомбинантов содержала налидиксиновую кислоту и один из остальных изученных антибиотиков в зависимости от того, на какой из них был резистент бактерия-донор. Из каждого скрещивания изолировали по 2 ... 10 клон бактерий-рекомбинантов, очищали их путем посева того же состава и определяли на наличие типичных для них биохимических признаков, маркеров резистентности и аутотрофность. Для выявления числа клеток бактерий-доноров применялись вышеперечисленные селективные среды без налидиксиновой кислоты. Частоту передачи R-плазмид вычисляли по числу клеток-доноров в смешанных культурах. Для выяснения совместной передачи R-, Col- и Nly-плазмид в случае применения $R^+Col^+Nly^-$, $R^+Col^-Nly^+$ или $R^+Col^+Nly^+$ бактерий-доноров у изолированных рекомбинантов определяли способность продуцировать колицин и β -гемолитизин.

Передачу Nly-плазмид в процессе конъюгации осуществляли по методу Колякова /40/ при температурах 37° и 25° , про-

вода селекцию рекомбинантов на основе резистентности штамма-реципиента *E. coli* 14 pal-g на налидиксиновую кислоту.

Для выявления передачи Col-плазмид в процессе конъюгации нами была разработана методика на основе четырехслойного агара по Вже /45/. Условия конъюгации были такие же как при передаче R-плазмид. Для выявления передачи Col-плазмид селекцию проводили следующим образом. После 4-часового инкубирования при 37° и параллельно при 25° разные разведения смешанной культуры засеивали в ряд пробирок, содержащих по 3 мл 0,5%-ного мясопептонного агара, разбавленного и охлажденного до 45°. Смесь перемешивали и разливали в чашки Петри на поверхность 1,5%-ного мясопептонного агара, содержащего 50 мкг/мл стрептомицина. Третий слой приготавливали из 1,5%-ного мясопептонного агара для того, чтобы бактерии не могли расти на поверхности агара. Чашки Петри инкубировали 24 часа, после чего покрывали слоем 0,5%-ного агара, содержащего коллиночувствительные индикаторные бактерии *E. coli* K12 J6-2 или P678. Частоту передачи Col-плазмид определяли по отношению к клеткам реципиента. Разработанная нами методика позволяла определять одновременно частоту передачи Col-плазмид, выявить Col⁺-рекомбинанты и изолировать вышеназванные рекомбинантные колонии.

Результаты исследований

В первой серии опытов определяли встречаемость маркеров лекарственной устойчивости у штаммов *E. coli*, изолированных от поросят. Выяснилось, что из 250 штаммов 175, т.е. 70,0%, являлись резистентными к I...6 изученному веществу (табл. 1). Преобладала резистентность к тетрациклину (73,1%), а резистентность к хлорамфениколу найдена лишь в 8,6% случаев. Встречаемость маркеров резистентности к стрептомицину, пенициллину и неомицину колебалась в пределах 24,6...31,4% среди резистентных культур *E. coli*. Большинство изученных культур являлись моно- (36,8% и дирезистентными (23,2%), а также чувствительными (30,0%) ко всем изученным лекарственным веществам (табл. 2). Только 13 культур (5,2%) являлись резис-

тентными к трем, 8 культур (3,2%) - к четырем и две (0,8%) - к пяти и шести лекарственным препаратам.

Как видно из данных, приведенных в таблице 3, всего среди 175 резистентных культур было найдено 25 разных комбинаций маркеров резистентности. Чаще всего встречалась монорезистентность к тетрациклину - 58 культур (33,1%), а также к стрептомицину - 13 культур (7,4%) и дирезистентность к тетрациклину и стрептомицину - 15 культур (8,6%) и тетрациклину и неомицину - 21 культура (12,0%). Следовательно, среди штаммов *E. coli*, изолированных от поросят, большинство являлись монорезистентными в отношении тетрациклина. Сравнительно часто встречалась резистентность к неомицину, а только единичные штаммы являлись резистентными к хлорамфениколу.

Во второй серии опытов применялись 163 резистентные культуры *E. coli* в качестве бактерий-доноров для выяснения наличия R-плазмид в опытах конъюгации со стандартным штаммом-реципиентом *E. coli* K12 J6-2 R⁻nal-g. Трансмиссивные R-плазмиды были выявлены у 127 штаммов *E. coli*, т.е. в 77,9% случаев среди изученных донорских штаммов или в 50,8% случаев из всех изученных нами 250 штаммов бактерий (табл. I). У 12 культур малорезистентных или резистентных к налидиксиновой кислоте наличие трансмиссивных R-плазмид не изучалось, т.к. реципиент являлся резистентным к этому веществу. Чаще всего в составе трансмиссивных R-плазмид находился ген тетрациклинорезистентности (77,2%). Наличие гена неомицинорезистентности является характерным и сравнимым с встречаемостью с генами стрептомицино- (37,2%) и пенициллинорезистентности (23,6%). Только у 10 штаммов в составе трансмиссивных R-плазмид было выявлено наличие гена хлорамфениколрезистентности (7,9%).

В подавляющем большинстве случаев в составе 127 трансмиссивных R-плазмид находился только один (44,9%) или два (39,4%) гена резистентности (табл.2). У 35 штаммов в составе R-плазмид встречался только ген тетрациклинорезистентности (27,6%), у 21 штамма гены тетрациклино- и неомицинорезистентности (16,5%), у 15 штаммов гены тетрациклино- и стрептомицинорезистентности (11,8%), у 11 штаммов ген стрептомицино-

зистентности (8,7%) и у 8 штаммов гены тетрациклино- и пенициллинорезистентности (6,3%) (табл. 3). Эти 5 типов R-плазмид встречались у 90 штаммов (70,9%), в то время как остальные 13 типов R-плазмид из 18 выявленных встречались только у 37 штаммов (29,1%). Принимаемая нами методика передачи R-плазмид не позволила выявить возможного наличия разных R-плазмид в одном донорском штамме.

Частоту передачи R-плазмид в процессе конъюгации изучали сравнительно при 25° и при 37°. Средняя частота передачи R-плазмид была в 5...15 раз выше при 25° (табл. 3 и 4). Возможная температурочувствительная передача R-плазмид выявлялась в случае тетрациклинового гена, а также в случае пенициллинового гена в составе R-плазмиды.

В связи с применением системы низкой частоты передачи (LFT-система) R-плазмид в процессе конъюгации частота передачи изучаемых R-плазмид была сравнительно низкая и разница в частотах передачи при 25° и при 37° была не очень большая (табл.3). Однако у 25 штаммов передача R-плазмид осуществлялась только при 25°, у 81 штамма частота передачи R-плазмид была в 5...10 раз, а в некоторых случаях в 100 раз выше при 25° (табл. 4). У 28 штаммов передача R-плазмид осуществлялась около 100 раз эффективнее при 25°, по сравнению с соответствующими частотами при 37°. Итак, по крайней мере в некоторых случаях, можно предполагать наличие температурочувствительных R-плазмид среди штаммов *E.coli*, изолированных от поросят.

В третьей серии опытов было выявлено наличие и передача Col-плазмид у изученных штаммов *E. coli*. Из 250 культур 91 (36,4%) являлись колициногенными (табл. 5). Интересно отметить, что в то время как среди чувствительных культур *E.coli* только 12,0% являлись колициногенными, среди резистентных культур наличие Col-плазмид выявлялось в 46,9% случаев, а среди культур, имеющих трансмиссивные R-плазмиды, - в 61,5% случаев. Как видно из данных, приведенных в таблицах 3 и 5, наличие Col-плазмид связывается с типами резистентности и типом R-плазмид. В то время как, например, среди Tc-резистентных культур колициногенными являлись 58,6% штаммов и

среди стрептомицинорезистентных культур - 70,9%, из 21 Tc.Nm-резистентной культуры, имеющих R-плазмиды типа R(tet-neo), ни один не являлся колициногенным.

В процессе конъюгации из изученных 52 Col⁺-культур E. coli передача Col-плазмид осуществлялась в 33 случаях (63,5%). Из 26 Col⁺-культур, имеющих трансмиссивные R-плазмиды, у 22 культур E. coli (84,6%) совместно с передачей Col-плазмид осуществлялась и передача R-плазмид. Среди этих культур был один штамм, изолированный от поверхности двери на ферме. С другой стороны, среди 26 Col⁺R⁻-штаммов передача Col-плазмид выявлялась в 11 случаях (42,3%). Следовательно, передача Col-плазмид происходит преимущественно совместно с R-плазмидами.

По диаметру задержки роста индикаторного микроба вокруг колициногенных культур рекомбинантные Col⁺R⁺-штаммы имели несколько меньший диаметр по сравнению с донорными Col⁺R⁺-штаммами. Фенотипическое проявление колициногенности и передача Col-плазмид были одинаковыми при 25° и при 37°.

Все изученные 250 культур подвергались изучению на способность продуцировать β-гемолизин. Выяснилось, что лишь 12 штаммов (4,8%) являлись гемолитическими (табл. 6). Из изученных в процессе конъюгации 10 гемолитических штаммов Hly-плазмиды передавалась в 5 случаях. Всегда совместно с Hly-плазмидами передавались R-плазмиды. Следует отметить, что из четырех лекарственноустойчивых колициногенных и гемолитических культур совместно с Hly-плазмидами передавались также R(tet)- и Col-плазмиды. Влияние температуры культивирования отмечалось лишь в случае передачи HlyR(Tc) комплекса - при 37° происходила совместная передача, а при 25° передавалась лишь R-плазида, что свидетельствует о том, что совместная передача Hly-, R- и Col-плазмид не является результатом их стабильной рекомбинации.

Обсуждение

При изучении встречаемости резистентности к антибиоти-

Встречаемость маркеров резистентности к лекарственным веществам у штаммов *E. coli*, изолированных от поросят, и г-генов в составе трансмиссивных R-плазмид этих же штаммов^x

Всего штаммов	%	Наличие маркеров резистентности или г-генов в составе трансмиссивных R-плазмид ^{xx}						
		Sm	Tc	Cm	Rn	Nm	Nx	чувствительные
250		55	128	15	43	48	12	75
%	100,0	22,0	51,2	6,0	17,2	19,2	4,8	30,0
% из 175 резистентных культур	70,0	31,4	73,1	8,6	24,6	27,4	6,8	0
с R-плазмидами	%	str	tet	chl	pen	neo	nal	
127	50,8	47	98	10	30	37	NT ^{xxx}	-
%	100,0	37,0	77,2	7,9	23,6	29,1	-	-
% из 163 донорных культур	77,9	28,8	60,1	6,1	18,4	22,7	-	-

^x 10 штаммов бактерий были изолированы от поверхности окон и дверей

^{xx} Маркеры резистентности к стрептомицину (Sm), тетрациклину (Tc), хлорамфениколу (Cm), пенициллину (Pn), неомицину (Nm), и налидиксиновой кислоте (Nx). Гены резистентности в составе трансмиссивных R-плазмид к стрептомицину (str), тетрациклину (tet), хлорамфениколу (chl), пенициллину (pen), неомицину (neo) и налидиксиновой кислоте (nal).

^{xxx} NT - у 12 штаммов, резистентных к налидиксиновой кислоте, наличие трансмиссивных R-плазмид

Т а б л и ц а 2

Распространение маркеров резистентности к лекарственным веществам у штаммов *E. coli* и r-генов в составе трансмиссивных R-плазмид

Штаммы <i>E. coli</i>	Количество маркеров резистентности или r-генов в составе трансмиссивных R-плазмид ^X							Всего
	I	2	3	4	5	6	0	
Число типов резистентности	6	8	6	3	I	I	0	25
Количество штаммов	92	58	13	8	2	2	75	250
%	36,8	23,2	5,2	3,2	0,8	0,8	30,0	100,0
Число типов R-плазмид	5	5	4	3	I	II ^X	-	18
Количество штаммов	57	50	11	8	I	-	-	127
%	44,9	39,4	8,7	6,3	0,8	-	-	100,0

^X II - наличие R-плазмид у резистентных к налидиксиновой кислоте штаммов бактерий не изучалось

Спектр резистентности штаммов *E. coli* и тип R-плазмид, установленные при конъюгации со штаммом-реципиентом *E. coli* K12 J6-2 R^{nal}-r

Спектр резистентности штаммов <i>E. coli</i> ^x	Число штаммов			Тип R-плазмиды ^{xx}	Средняя частота передачи при	
	Всего	доноров	R ⁺		37°	25°
Tc	58	58	34	tet	0,6 x 10 ⁻⁷	0,1 x 10 ⁻⁶
Tc.Nm	15	15	15	tet-str	0,8 x 10 ⁻⁷	0,2 x 10 ⁻⁶
Tc.Pn	9	9	9	tet-pen(8); tet(1)	0,5 x 10 ⁻⁵	0,2 x 10 ⁻⁴
Tc.Nx	1	-	-	-	-	-
Tc.Nm	21	21	21	tet-neo	0,3 x 10 ⁻⁶	0,4 x 10 ⁻⁵
Tc.Cm.Pn	6	6	6	tet-str-pen	0,5 x 10 ⁻⁶	0,3 x 10 ⁻⁵
Tc.Cm.Nm	2	2	2	tet-str-neo	0,5 x 10 ⁻⁶	0,6 x 10 ⁻⁵
Tc.Pn.Nm	2	2	2	tet-pen-neo	0,7 x 10 ⁻⁶	0,6 x 10 ⁻⁵
Tc.Nm.Nx	1	-	-	-	-	-
Tc.Pn.Cm	1	1	1	tet-str-chl	0,6 x 10 ⁻⁷	0,1 x 10 ⁻⁶
Tc.Pn.Cm.Nm	1	1	1	tet-str-chl-neo	0,4 x 10 ⁻⁷	0,4 x 10 ⁻⁷
Tc.Nm.Cm.Pn	2	2	2	tet-str-chl-pen	0,7 x 10 ⁻⁶	0,8 x 10 ⁻⁵
Tc.Pn.Cm.Nm	5	5	5	tet-str-pen-neo	0,1 x 10 ⁻⁷	0,5 x 10 ⁻⁶
Tc.Pn.Cm.Pn.Nm	2	2	1	tet-str-chl-pen-neo	-	-
Tc.Nm.Pn.Pn.Nm.Nx	2	-	-	-	-	-
Str	12	12	12	str	0,4 x 10 ⁻⁶	0,6 x 10 ⁻⁶
Str.Cm	4	4	4	str-chl	0,4 x 10 ⁻⁷	0,3 x 10 ⁻⁷
Str.Nx	1	-	-	-	-	-
Str.Pn.Nx	1	-	-	-	-	-
Cm	3	3	3	chl	-	-
Pn	8	8	8	pen	0,8 x 10 ⁻⁵	0,2 x 10 ⁻⁴
Pn.Nm	6	6	6	pen-neo	-	-
Nm	5	5	4	neo	0,7 x 10 ⁻⁷	0,8 x 10 ⁻⁷
Nm.Nx	1	-	-	-	-	-
Nx	5	-	-	-	-	-

^x Маркеры резистентности к стрептомицину (sm), тетрациклину (Tc), хлорамфениколу (Cm), пенициллину (Pn), неомицину (Nm) и налидиксовой кислоте (Nx).

^{xx} Гены резистентности R-плазмид к стрептомицину (str), тетрациклину (tet), хлорамфениколу (chl), пенициллину (pen), неомицину (neo).

"-" не изучалось

Т а б л и ц а 4

Передача R-плазмид в процессе конъюгации при разных температурах на штамм-реципиент *E. coli* K12 J6-2 R⁻ nal-r

№ п/п	Тип R-плазмиды ^x	Чис- ло R ⁺ штам- мов	Число штаммов					
			Передача R-плаз- мид осуществляет- ся при			Частота передачи R-плазмид при		
			толь- ко 25°	толь- ко 37°	25° и 37°	25° и 37°	>10 раз выше	>10 раз ниже
1.	tet	34	9	3	22	0	28	6
2.	tet-str	15	6	0	9	6	9	0
3.	tet-pen	9	3	0	6	2	6	1
4.	tet-neo	21	0	0	21	7	12	2
5.	tet-str-pen	6	2	0	4	4	2	0
6.	tet-str-neo	2	0	0	2	0	2	0
7.	tet-pen-neo	2	0	0	2	0	2	0
8.	tet-str-chl	1	0	0	1	1	0	0
9.	tet-str-chl-neo	1	0	0	1	1	0	0
10.	tet-str-chl-pen	2	0	0	2	0	1	1
11.	tet-str-pen-neo	5	0	0	5	3	1	1
12.	tet-str-chl-pen-neo	1	1	0	0	0	1	0
13.	str	11	4	0	7	0	11	0
14.	str-chl	4	0	1	3	2	0	2
15.	chl	2	0	0	2	1	0	1
16.	pen	5	0	1	4	0	4	1
17.	pen-neo	2	0	0	2	0	2	0
18.	neo	4	0	0	4	1	0	3
Всего		127	25	5	97	28	81	18

^x Гены резистентности R-плазмид к стрептомицину (str), тетрациклину (tet), хлорамфениколу (chl), пенициллину (pen), неомизину (neo).

Таблица 5

Передача Col-плазмид в процессе конъюгации на штамм-реципиент E. coli 17 Col⁻str-r

Спектр чувствительности штаммов E. coli ^x	Число штаммов		Наличие R-плазмид у Col ⁺ -штаммов	Число штаммов, передававших Col-и R-плазмиды от Col ⁺ -доноров				Передача Col-плазмид
	Всего	Col ⁺		Col ⁻ R ⁻	Col ⁻ R ⁺	Col ⁺ R ⁻	Col ⁺ R ⁺	
Tc	58	34(58,6) ^{xx}	22(64,7)	4	3	8	19 ^{xxx}	27 (79,4)
Pn	8	5	2	1	1	2	1	3
Tc.Pn	9	2	2	0	0	0	2 ^{xxxx}	2
Pn.Nm	6	1	0	1	0	0	0	0
Nx	5	1	0	1	0	0	0	0
чувствительные	75	9(12,0)	0	8	0	1	0	1
Всего	161	52(32,3)	26(50,0)	15	4	11(42,3)	22(84,6)	33 (63,5)
Sm (+ другие маркеры) - 13 типов	55	39(70,9)	30(76,9)	NT	NT	NT	NT	NT
Остальные 7 типов	34	0	0	5	29	0	0	0

^x Маркеры резистентности к стрептомицину (Sm), тетрациклину (Tc), пенициллину (Pn), неомицину (Nm) и налидиксиновой кислоте (Nx).

^{xx} В скобках приведен процент.

^{xxx} 4 штамма изолированы от поверхности дверей.

^{xxxx} 1 штамм изолирован от поверхности окна и передавался совместно с Col-плазмидой R(Tc)-плазмид.

Т а б л и ц а 6

Передача Hly-плазмид в процессе конъюгации
на штамм-реципиент E. coli 14 nal-r

Фенотип штаммов ^x доноров	Число Hly ⁺ штаммов		Передача Hly-, R- и Col- плазмид ^{xx}	Число штаммов, передавав - ших Hly- плазмиду
	всего	доноров		
Hly, Tc	1	1	Hly, R(tet)	1
Hly, Pn	1	1	R(pen)	0
Hly, Sm	1	1	R(str)	0
Hly, Sm, Tc	1	1	Hly, R(str-tet)	1
Hly, Tc, Col ⁺	3	3	Hly, R(tet), Col ⁺	3
Hly, Tc, Col ⁺	1	1	R(tet), Col ⁺	0
Hly	2	0	-	0
Hly, Nx	2	0	-	
Всего (250 штаммов)	12 (4,8%)	10		5 (2,0%)

^x Маркеры резистентности к стрептомицину (Sm), тетрациклину (Tc), пенициллину (Pn) и налидиксиновой кислоте (Nx); способность к продукции β-гемолизина (Hly) и колицина (Col⁺).

^{xx} Гены резистентности R-плазмид к стрептомицину (str), тетрациклину (tet) и пенициллину (pen). Наличие плазмид колициногенности (Col⁺) и плазмид, определяющих продукцию β-гемолизина (Hly).

кам у штаммов энтеробактерий, изолированных от животных, надо иметь в виду, откуда изолированы эти штаммы бактерий. Если на ферме широко используются антибиотики для повышения продуктивности животных, то происходит быстрая селекция резистентных бактерий /1, 7, 15, 46/. В наших опытах мы изолировали штаммы *E. coli* от поросят на одной из передовых ферм Эстонии. Выяснилось, что 75 штаммов (30,0%) являлись чувствительными ко всем 6 изученным антибиотикам. Из резистентных культур большинство являлось резистентными к тетрациклину, а также к неомицину и чувствительными к хлорамфениколу, что совпадает с результатами других авторов /II-12, 47/. В более ранних наших исследованиях /36-39/, где были изучены штаммы *E. coli*, изолированные из разных маленьких ферм, выявлялся очень высокий уровень встречаемости патогенных штаммов *E. coli* с R-плазмидами, похожими на R-плазмиды человеческого происхождения.

В настоящее время известно, что резистентность у подавляющего большинства штаммов *E. coli* обусловлена наличием R-плазмид, которые могут быть трансмиссивными или нетрансмиссивными. В наших опытах наличие трансмиссивных R-плазмид было выявлено в 77,9% случаев из 163 изученных культур *E. coli*. В составе R-плазмиды часто был только один маркер резистентности, в частности ген резистентности к тетрациклину, что отличает эти плазмиды от R-плазмид у штаммов бактерий, изолированных нами от людей /38, 48/.

Сравнительное изучение передачи R-плазмиды в процессе конъюгации при 25° и при 37° показало, что у 25 штаммов *E. coli* передача осуществлялась только при 25°, а у 81 штамма частота передачи была ниже при 37°. Возможная температурочувствительная передача R-плазмид осуществлялась в случае тетрациклинового и, возможно, в случае пенициллинового гена. Температурочувствительные R-плазмиды выявлены другими авторами в случае тетрациклинового и неомицинового гена /II, I3-I4/.

Col-плазмиды были выявлены у 91 культуры (36,4%). Передача Col-плазмид происходила чаще совместно с R-плазмидами и от штаммов, имеющих трансмиссивные R-плазмиды. Так, передача Col-плазмид была найдена у 22 R⁺Col⁺-культур (84,6%) и у 11 R⁻Col⁺-культур (42,3%). Можно предположить, что трансмиссив-

ные R-плазмиды мобилизируют нетрансмиссивные Col-плазмиды /3, 49/, хотя специально этот вопрос нами не изучался.

В отличие от других авторов /22, 49-50/ нами были найдены H₁U-плазмиды только у отдельных штаммов E.coli. Вероятно, это связано с тем, что на изученной ферме циркулирует очень мало вирулентных штаммов E.coli, а также в применяемой методике выявления этих плазмид.

Весьма интересными оказались данные по изучению грам-отрицательных лактозонегативных штаммов бактерий, изолированных от поверхностей окон и дверей. Нам удалось показать наличие трансмиссивных R- и Col-плазмид у этих штаммов бактерий, причем тип R-плазмиды R(Tc) совпадал с преобладающим типом R-плазмид у изученных штаммов, изолированных от животных.

Известно, что в пыли воздуха ферм находится огромное количество бактерий кишечной группы /51/. Бактерии с трансмиссивными R-плазидами выделены и ранее другими авторами от поверхностей фермовых строений, из почвы и воды вблизи ферм /9, 52/. Доказано, что на фермах происходит самозаражение животных и людей /4, 6-7, 9/. С другой стороны, анаэробные условия и химический состав содержимого кишечного тракта должен значительно уменьшать вероятность передачи плазмид от одного микроба другому /53-56/. На основе наших предыдущих работ /48/ и данных настоящего исследования можно предполагать, что при заражении животных и людей бактерии могли приобрести R-плазмиды в процессе конъюгации уже во внешней среде перед инфекцией. Если это действительно так, то на крупных фермах надо соблюдать такие условия содержания животных, чтобы самозаражение микробами кишечной группы было доведено до минимума.

Выводы

I. Около одной трети штаммов E. coli, изолированных от поросят, являются чувствительными к антибиотикам. Среди изученных 163 резистентных штаммов трансмиссивные R-плазмиды были выявлены в 77,9% случаев.

2. Характерными типами R-плазмид у штаммов *E. coli*, изолированных от поросят, являются R(Tc), R(Sm.Tc), R(Tc.Nm), хотя всего были выявлены 18 разных типов R-плазмид. Передача R-плазмид в процессе конъюгации во многих случаях температурочувствительна.

3. Из изученных 250 культур 91 (36,4%) являлась колициногенной. Передача Col-плазмид осуществлялась в 63,5% случаев, причем от штаммов, имеющих трансмиссивные R-плазмиды, в 84,6% случаев.

4. Гемолитические штаммы *E. coli* встречались в 4,8% случаев. Передача Hly-плазмид осуществлялась совместно с R- и Col-плазмидами.

5. Трансмиссивные R- и Col-плазмиды встречаются у штаммов бактерий, изолированных от поверхностей окон и дверей животноводческих ферм.

6. Выдвигается предположение о возможной передаче R-плазмид во внешней среде как главного фактора их распространения среди разных штаммов энтеробактерий.

7. Предлагается соблюдать на крупных животноводческих фермах такие условия содержания животных, чтобы самозаражение микробами кишечной группы было доведено до минимума. Это препятствует распространению вирулентных с R-плазмидами штаммов бактерий.

Л и т е р а т у р а

1. Jukes, T.H. The present status and blackground of antibiotics in the feeding of domestic animals. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1971, 182, 362-379.
2. Кавак Х.Х. Колибактериоз поросят, его лечение и профилактика антибиотиками. Автореф. дисс. канд. вет. наук, Тарту, 1968.
3. Завьянцев В.Е. Трансмиссивная лекарственная устойчивость и колициногенность штаммов *E. coli*, выделенных от поросят. Антибиотики, 1976, 6, 530-532.

4. Lehman, R.P. Implementation of the recommendations contained in the report to the Commissioner concerning the use of antibiotics in animal feed. *J. Amer. Sci.*, 1972, 35, 1340-1341.
5. Linton, K.B., Lee, P.A., Richmond, M.H., Gillespie, W.A., Rowland, A.J., Baker, V.N. Antibiotic resistance and transmissible R-factors in the intestinal coliform flora of healthy adults and children in an urban and rural community. *J. Hyg. (Camb.)*, 1972, 70, 99-104.
6. Wells, D.M., James, O.B. Transmission of infections drug resistance from animals to man. *J. Hyg. (Camb.)*, 1973, 71, 209-215.
7. Fein, D., Burton, G., Tsutakawa, R., Blendon, D. Matching of antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* of farm families and their animals. *J. Infect. Dis.*, 1974, 130, 274-279.
8. Hirsh, D.C., Burton, G.C., Blendon, D.C. The effect of tetracycline upon establishment of *Escherichia coli* of bovine origin in the enteric tract of man. *J. Appl. Bacteriol.*, 1974, 37, 327-333.
9. Marsik, F.J., Parisi, J.T., Blendon, D.C. Transmissible drug resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* from humans, animals, and their rural environments. *J. Infect. Dis.*, 1975, 132, 296-302.
10. Grant, A.J., Pittard, J. Incompatibility reactions of R plasmids isolated from *Escherichia coli* of animal origin. *J. Bacteriol.*, 1974, 120, 185-190.
11. Sato, G., Kodama, H. Appearance of R-factor mediated drug resistance in *Salmonella typhimurium* excreted by carrier calves on a feedlot. *Jap. J. vet. Res.*, 1974, 22, 72-79.
12. Mitsuhashi, S., Hashimoto, H., Suzuki, K. Drug resistance of enteric bacteria XIII. Distribution of R factors in *Escherichia coli* strains isolated from livestock. *J. Bacteriol.*, 1967, 94, 1166-1169.
13. Terawaki, Y., Takayasu, H., Akiba, T. Thermosensitive replication of kanamycin resistance factor. *J. Bacteriol.*,

- 1967, 94, 687-690.
14. Sato, G., Kodama, H., Terakado, N. Detection of an R factor showing temperature-sensitive transfer in *Salmonella typhimurium* isolated from calves. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1974, 5, 541-543.
 15. Walton, J.R. In vivo transfer of infectious drug resistance. *Nature*, 1966, 211, 312-313.
 16. Jarolman, H., Kemp, G. R-factor transmission in vivo. *J. Bacteriol.*, 1969, 99, 487-490.
 17. Guineé, P.A.M. R transfer to *S. panama* in vitro and in vivo. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 1968, 34, 93-98.
 18. Smith, M.G. In vivo transfer of R factor between *Escherichia coli* strains inoculated into the rumen of sheep. *J. Hyg.*, 1975, 75, 363-370.
 19. Tschäpe, H., Rische, H. Die Virulanz-Plasmide der *Enterobacteriaceae*. *Z. Allg. Microbiol.*, 1974, 14, 337-350.
 20. Smith, H.W., Linggood, H.A. Observation on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *E. coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *J. med. Microbiol.*, 1971, 4, 467-485.
 21. Smith, H.W., Halls, S. The transmissible nature of the genetic factor in *E. coli* that control haemolysin production. *J. gen. Microbiol.*, 1967, 47, 153-161.
 22. Ратнер Ю.А. Сравнительная характеристика Hly-факторов разного происхождения как агентов фертильности у *E. coli*. - *Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.*, 1972, № 5, 92-97.
 23. Талмейстер Э.Т. Изучение трансмиссивного фактора, контролирующего гемолитические свойства у разных штаммов кишечной палочки. - *Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.*, 1972, № 2, 124
 24. Kudlai, D.G., Bornova, S.S., Rachesinov, A.H. Balanin, W.V. Extrachromosomal determinants of haemolysin synthesis in *E. coli*. *X. Internat. Congr. Microbiol.*, 1970, 60.

25. Goebel, W., Royer-Pokora, B., Lindenmaier, W., Bujard, H. Plasmids controlling synthesis of hemolysin in *Escherichia coli*: molecular properties. *J. Bacteriol.*, 1974, 118, 964-973.
26. Smith, H.W., Halls, S. The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls enterotoxin production. *J. Gen. Microbiol.*, 1968, 52, 319-334.
27. Gyles, C.L., So, M., Falkow, S. The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 1974, 130, 40-49.
28. So, M., Crosa, J.H., Falkow, S. Polynucleotide sequence relationships among Ent plasmids and the relationship between Ent and other plasmids. *J. Bacteriol.*, 1975, 121, 234-238.
29. So, M., Boyer, H.W., Betlach, M., Falkow, S. Molecular cloning of an *Escherichia coli* plasmid determinant that encodes for the production of heat-stable enterotoxin. *J. Bacteriol.*, 1976, 128, 463-472.
30. Orskov, J., Orskov, F. Episome carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. I Transmission of the determinant of the K88 and influence of the transfer of chromosomal markers. *J. Bacteriol.*, 1966, 91, 69-75.
31. Jones, G.W., Rutter, J.M. Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect. Immunity*, 1972, 6, 918-927.
32. Bak, A.L., Christiansen, G., Christiansen, C., Stenderup, A., Orskov, I., Orskov, F. Circular DNA molecules controlling synthesis and transfer of the surface antigen (K88) in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 1972, 73, 373-385.
33. Smith, H.W., Linggood, M.A. Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypic piglet strains and by calf and lamb strains: the transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. *J. Med. Microbiol.*, 1972, 5,

243-249.

34. Falkow, S., Williams, L.P., Jr., Seaman, S.L., Rollins, L.D. Increased survival in calves of *Escherichia coli* carrying an Ent plasmid. *Infect. Immunity*, 1976, 13, 1005-1007.
35. Печенин О.Д. Изучение эпизомных факторов гемолитической активности в естественных популяциях кишечных палочек. - *Ж.микробиол.эпидемиол.иммунобиол.*, 1974, № 2, 24-27.
36. Хейнару А., Таллмейстер Э. О трансмиссивной устойчивости к лекарственным веществам у штаммов кишечных палочек, изолированных от поросят и телят. *Мат. симп. по болезням молодняка. Ротапринт ЭСХА*, 1969, 19-21 (на эст. яз.).
37. Тылга В.В., Таллмейстер Э.Т., Хейнару А.Л. Чувствительность и трансмиссивная устойчивость к антибиотикам штаммов кишечной палочки, выделенных от поросят и телят. *Сб. научн. трудов Эст. НИИЖВ*, 1970, № 21, 35-41.
38. Хейнару А.Л., Таллмейстер Э.Т. R-факторы и поведение их детерминантов и штаммов энтеробактерий различного происхождения. - *Генетика*, 1971, 7, 130-140.
39. Кхкам А., Хейнару А.Л. О колюциногенности колибактерий, изолированных от телят. *Сб. научн. трудов Эст. НИИЖВ*, 1974, № 32, 38-41.
40. Коляков Я.Е. *Ветеринарная микробиология. "Колос"*, 1965.
41. Wilkins, B.M., Hollom, S.E. Conjugational synthesis of F lac⁺ and Col I DNA in presence of rifampicin and in *Escherichia coli* K12 mutants defective in DNA synthesis. *Molec. gen. Genet.*, 1974, 134, 143-156.
42. Davis, B.D., Mingioli, E.S. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamine B₁₂. *J. Bacteriol.*, 1950, 60, 17-28.
43. Otte, H.J., Köhler, W. *Die Praxis der Resistenz- und Spiegelbestimmungen zur antibiotischen Therapie*. Jena, Veb. G. Fisher Verlag, 1958, 18.
44. Fredericq, P. Actions antibiotiques réciproques chez les *Enterobacteriaceae*. *Rev. Belge Path. Med. Exptl.*, 1948,

19, Suppl. 1, 1-107.

45. Vieu, J.F. Recherche et numeration des bacteries colicinogenes. Ann. Inst. Pasteur, 1959, 97, 117-120.
46. Linton, A.H., Howe, K., Osborne, A.D. The effect of feeding tetracycline, nitrovin and quindoxin in the drug resistance of coli-aerogenes bacteria from calves and pigs. J.Appl. Bacteriol., 1975, 38, 255-275.
47. Lavoie, M., Mathieu, L.G. Incidence of hemolytic and R factors in lactose-fermenting enteric bacteria isolated from the digestive tract of fish. Rev. can. biol., 1974, 33, 185-191.
48. Хейнару А.Л., Лейс К.Е., Илус Т.А., Кнхо С.К. Трансмиссионная устойчивость к антибиотикам у штаммов Shigella sonnei с различным ферментативным типом. Сб. докл. П респ. съезда эпидемиол. микробиол. инф. и гиг., Таллин, 1972, 122-125.
49. Świdorski, M., Lachowicz, T.M. Occurence and transfer of antibiotic resistance, colicinogeny and haemolysin production in Escherichia coli strains isolated from cases of coli-bacillosis. Acta microbiol.polon., 1974, ser. A, 6, 155-162.
50. Jorgensen, S.T., Poulsen, A.L. Antibiotic resistance and Hly plasmids in serotypes of Escherichia coli associated with porcine enteric disease. Antimicrob. Agents Chemother., 1976, 9, 6-10.
51. Harry, E.G. The survival of Escherichia coli in the dust of poultry houses. Veterin. Rec., 1964, 76, 466-470.
52. Macuch, P., Seckarava, A., Parrakova, E., Kremery, V., Vymola, F. Transfer of tetracycline resistance from Escherichia coli to other Enterobacteriaceae in vitro.
53. Watanabe, T. Infectious heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev., 1963, 27, 87-115.
54. Salzman, T.C., Klemm, L. Transfer of antibiotic resistance (R-factors) in the mouse intestine. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1968, 128, 392-394.
55. Mitchell, I. de G., Kenworthy, R. Attempted elimination of plasmid-determined haemolysin, K88 antigen and

- enterotoxin from *Escherichia coli* pathogenic for pigs. *J. Appl. Bacteriol.*, 1977, 42, 207-212.
56. Burman, L.G. Expression of R-plasmid functions during anaerobic growth of an *Escherichia coli* K12 host. *J. Bacteriol.*, 1977, 131, 69-74.

**On R-, Col- and Hly-plasmids in the strains
of bacteria isolated from piglets**

A. Heinaru, R. Kirch, E. Tallmeister

S u m m a r y

The distribution of the drug resistance factors and R-, Col- and Hly-plasmids in the 240 strains of *E. coli* isolated in the case of diseases from piglets as well as 10 strains of enterobacteria isolated from the doors and the windows of the farm were investigated.

About one third of the strains were sensitive to all 6 antibiotics studied. Out of 163 resistant strains 127(77.9%) had transferrable R-plasmids. They fell into 18 types of R-plasmids. The most characteristic types were R(tet), R(str-tet) and R(tet-neo). The transfer via conjugation of many of the R-plasmids investigated was temperature-sensitive.

The colicinogenic factors were present in 36.4 per cent of the strains investigated. Transferable Col-plasmids were found in 63.5 per cent of the strains and in 84.6 per cent of the strains having transferable R-plasmids. Some of the strains isolated from the doors and the windows of the farm carried transferable R- and Col-plasmids.

Out of 250 strains only 4.8 per cent had hemolytic properties. Transferable Hly-plasmids were transferring together with R- and Col-plasmids via conjugation.

The possibility of the transfer of R-plasmids under environmental condition as the main factor for the distribution of the R-plasmids among various enterobacteria was discussed. It is recommended to keep farm animals in such conditions where infection with normal intestinal flora between various groups of animals is less probable.

ВОЗНИКНОВЕНИЕ КОЛИЦИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У *ESCHERICHIA COLI* КАК УДОБНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИКАТОВ

А.Л. Хейнару, Р.Х. Метсик

Для первичной оценки мутагенного действия различных химических веществ и радиации наибольший интерес представляют системы, связанные с использованием бактерий. Удобным объектом для таких исследований служат полученные Эймсом /1/ тестерные штаммы *Salmonella typhimurium*, позволяющие определять частоту точковых обратных мутаций генов гистидинового оперона по типу замены пар оснований и сдвига рамки считывания.

Для выяснения частоты точковых прямых мутаций можно исследовать гены, определяющие резистентность к некоторым колицинам. По данным литературы известно, что резистентность к колицину E2 возникает в основном за счет мутаций по типу замены пар оснований /2/, а к колицину В - за счет делеций /3/.

В настоящей работе сделана попытка упростить методику Бриджиса с соавторами /2/ для изучения мутагенного действия химических веществ у *Escherichia coli*.

Материал и методика

Среды. Применяли мясопептонный бульон Хоттингера (рН 7,4), 0,5 и 1,5%-ный мясопептонный агар и в качестве буферного раствора - минимальную среду Дэвиса и Мингиоли /4/ без глюкозы и агара.

Штаммы. Для изучения возникновения резистентности к колицинам E2 и В использовали высокочувствительный к названным колицинам стандартный штамм *Escherichia coli* K12 P678 thr, leu, B1, str-r. Продукентами колицинов E2 и В являлись стандартные колициногенные штаммы *E. coli* SA-42 ColE2 и *E. coli* SA-18 ColB из коллекции Фредерика /5/.

Мутагенные вещества. Применяли гербицид отечественного производства 2.4-D диэтилсульфат (полученный от д.б.н.

Ю. Павела из Ингеваской селекционной станции) и моющие средства марки "Дипро" и "Пирита" (фирмы "Флора").

Методы. Количественность определяли по общепринятой методике /5/.

Для получения препарата колицинов в жидкой среде исследуемые культуры *E. coli* SA-18 ColB и *E. coli* SA-42 ColE2 выращивали в мясопептонном бульоне в течение 2 ... 4 дней при 37°C. Бактериальные клетки обрабатывали хлороформом и осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин. Прозрачную надосадочную жидкость сохраняли в холодильнике при 4°C. За титр колицина брали наибольшее разведение данного препарата, которое при нанесении маленькой капли на 1,5%-ную агаровую культуру (при посевной дозе 0,01 мл суточной бульонной культуры) давало прозрачную зону задержки роста этого микроба /6/.

Обработку мутагенами проводили по модифицированному методу Бриджиса с соавторами /2/. Для осаждения микробов 4 мл бульонной культуры индикаторного микроба *E. coli* K12 P678 в логарифмической фазе роста центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 мин. Осадок ресуспендировали в 4-х мл буферного раствора Дэвиса и Мингиоли и добавляли мутагенные вещества в концентрациях: 2.4-D - 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 мкг/мл; диэтилсульфат - 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 мкг/мл; "Пирита" - 0 и 0,3% и "Дипро" - 0 и 10%. После инкубирования в течение 60 мин при 37°C 1 мл этой культуры засеивали в 4 мл бульона и помещали на 4 часа в термостат при 37°C. Затем засеивали по 0,1 мл культуры в пробирки, содержащие по 3 мл разбавленного 0,5%-ного мясопептонного агара, охлажденного до 45°C, и добавляли 0,4 мл раствора колицина B и E2. Смесь перемешивали и разливали в чашки Петри на поверхность 1,5%-ного агара. После инкубации культур (в течение 24 и 48 час. в термостате при 37°C) производили учет резистентных к колицинам E2 и B колоний. Параллельно проделали аналогичные опыты без предварительного центрифугирования культур. В качестве контроля летального действия мутагена определяли количество живых клеток в мл среды на чашках Петри в 1,5%-ном мясопептонном агаре у обработанных и необработанных мутагенами культур, вы-

рациваемых в одинаковых условиях. Частоту мутаций определяли по числу колицинорезистентных мутантов на общее число живых клеток в мл обработанной культуры. В случае нулевой концентрации мутагена определяли спонтанную частоту возникновения колицинорезистентности.

Обсуждение

В настоящей работе разработана удобная методика определения мутагенного действия различных химических веществ на основании прямых мутаций резистентности к колицинам E2 и B, применяя при этом двухслойный метод агаровых пластинок. В работе Бриджиса с соавторами /2/ применялся трехслойный метод агаровых пластинок.

Полученные нами препараты колицинов E2 и B имели титр колицина 1/8. В опытах с 0,4 мл этих препаратов убивали все чувствительные к этим колицинам клетки бактерий E.coli K12 p678.

Наша работа является главным образом методической. Поэтому мы не представляем всех результатов, полученных в опытах по определению частоты мутаций различных химических веществ. В качестве предварительных данных представим наиболее характерные результаты, полученные в опытах (таблица).

Как видим, малые концентрации мутагенов сильно повышают частоту мутаций резистентности к колицинам E2 и B. При предварительном центрифугировании культур частота мутаций была выше, чем без центрифугирования культур. Наши предварительные опыты показывают и то, что на основании частоты мутаций при повышении концентрации мутагена возникновение резистентности к колицину E2 различается от резистентности к колицину B. Необходимо еще отметить, что в случае всех изученных мутагенов при повышении концентрации мутагена количество жизнеспособных клеток уменьшалось. Особенно сильно это выражалось при обработке культур диэтилсульфатом.

В результате можно заключить, что разработанная нами методика позволяет определять мутагенное действие уже при

очень низких концентрациях различных химических веществ. Поэтому исследуемая нами система является удобной моделью для исследования частоты прямых мутаций. Данная методика в принципе пригодна и для тестерных штаммов Эймса /1/. Тогда оказывается возможным в одной культуре определить частоту и обратных и прямых мутаций.

Т а б л и ц а

Частота мутаций резистентности к колицинам Е2 и В под влиянием различных мутагенных веществ

Мутагены	Концентрация	Частота мутаций к	
		колицину Е2	колицину В
2,4-D (без центрифугирования)	1 мкг/мл	$1,5 \times 10^{-5}$	$5,2 \times 10^{-5}$
2,4-D (с центрифугированием)	1 мкг/мл	$1,6 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-4}$
Диэтилсульфат (без центрифугирования)	1 мкг/мл	$1,1 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$
Диэтилсульфат (с центрифугированием)	1 мкг/мл	$1,6 \times 10^{-4}$	$0,4 \times 10^{-5}$
"Пирита" (без центрифугирования)	0,3%	$1,8 \times 10^{-4}$	-
"Дипро" (без центрифугирования)	10,0%	$1,5 \times 10^{-4}$	-
Спонтанная частота мутаций	0	$2,2 \times 10^{-7}$	$8,2 \times 10^{-7}$

Примечание: "-" не исследовались

Выводы

Разработанная нами методика определения частоты прямых мутаций резистентности к колицинам Е2 и В у *Escherichia coli* является удобной моделью для изучения мутагенного действия различных химических веществ.

Л и т е р а т у р а

1. Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1973, 70, 782.
2. Bridges, B.A., Motterhead, R.P., Colella, C. Induction of forward mutations to colicin E2 resistance in repair deficient strains of Escherichia coli: experiments with ultraviolet light and captan. Mutation Res., 1973, 21, 303-313.
3. Ishii, Y., Kondo, S. Spontaneous and radiation induced deletion mutations in Escherichia coli strains with different DNA repair capacities. Mutation Res., 1972, 16, 13-25.
4. Davis, B.D., Mingioli, E.S. Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B12. J. Bacteriol., 1950, 60, 17-28.
5. Fredericq, P. Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae. Rev. Belge Path. Exptl., 1948, 19, Suppl. 4, 1-107.
6. Maeda, A., Nomura, M. Interaction of colicine with bacterial cell. I. Studies with radioactive colicins. J. Bacteriol., 1966, 91, 685-694.

Induction of resistance to colicins in Escherichia coli as a suitable model for mutagenicity screening

A. Heinaru, R. Metsik

S u m m a r y

The model of induction of forward mutations to colicins E2 and B in strains of Escherichia coli is described. Due to the high sensitivity of the mutation system it proves a suitable model for mutagenicity screening.

УДК 591.465:577.9

Особенности дифференцировки и функционирования вспомогательных клеток яичевого фолликула дрозофилы. Вийкмаа М., Кярнер Ю. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 499. Труды по цитологии и генетике II, 1979, с. 5-14.

Электронномикроскопическими методами изучались структурная динамика, распределение кислой фосфатазы и экзогенной пероксидазы в яичевом фолликуле дрозофилы.

Открыто существование кольцевидных каналов между фолликулярными клетками. Обнаружено развитие концентрических мембранных систем в фолликулярных клетках к началу вителлогенеза и своеобразная дегградация участков цитоплазмы питающих клеток на последних стадиях вителлогенеза.

Предполагается, что фолликулярные клетки участвуют в вителлогенезе переносом в ооцит белков, синтезированных в самих этих клетках и пиноцитированных из гемолимфы, а также в дегградации трофобластов на конечных стадиях оогенеза.

Библ.-23; рис. - 16.

УДК 575.1:576.3.088.3

Цитогенетическая характеристика длительно культивированной каллусной культуры креписа. Каллак Х.И., Вапшер М.А. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 499. Труды по цитологии и генетике II, 1979, с. 18-25

Исследовалась каллусная культура, изолированная от проростков креписа и выращенная в течение 4,5 лет на агаровой питательной среде по Мурасиге и Скугу. В первых пассажах преобладали полиплоидные клетки (4х и >4х), наличие с 5-го пассажа появились и постепенно стали модальными анеуплоидные клетки 2n+1. Добавочная хромосома оказалась аберрантной. Культура характеризовалась низкой частотой (4-9%) аберрантных ана- и телофаз.

Библ. - 35; илл. - 7.

УДК 575.224.4:576.3.083.3

Культура растительных тканей как модель для изучения мутагенного действия гербицидов.

Каллак Х.И., Ярвекюльг Л.Я., Ваппер М.А. -
Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 499.

Труды по цитологии и генетике II, 1979, с. 30-44.

Исследовалась приемлемость культур растительных тканей для моделирования дифференциального действия гормонального гербицида 2,4-Д в зависимости от дозы и продолжительности действия и специфики реагирования подопытных каллусных культур гаглопаппуса, гороха и креписа. Обнаружены корреляции между токсичностью 2,4-Д и интенсивностью роста, а также между токсичностью гербицида и дифференциальной карiotипической изменчивостью подопытных культур: повышением резистентности сопровождается постоянство модального числа хромосом и повышение частоты аберративных ана- и телофаз.

Библи. - 19; илл. - 6.

УДК 591.821 [611-018.21]

Гистохимический анализ клеток эмбриональной селезенки в тканевой культуре. Пийрсоо А. -

Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 499.

Труды по цитологии и генетике II, 1979, с. 48-55.

В клетках тканевых культур эмбриональной селезенки гистохимически определялись активность кислой и щелочной фосфатазы, тиаминпиррофосфатазы, 5'-нуклеотидазы, неспецифической эстеразы и пероксидазы, а также количество ШИК-положительного материала и аргентофильность. Исползованные гистохимические тесты позволяют четко идентифицировать высокодифференцированные макрофаги от их предшественников, а также от фибробластоподобных и эндотелиальных клеток. Разница в отношении активностей кислой фосфатазы и пероксидазы дает возможность дифференцировать малодифференцированные клетки макрофагального ряда от предшественников нейтрофильных гранулоцитов.

Библи. - 32; рис. - 7.

Клеточный состав селезенки эмбрионов и новорожденных животных. Пейрсоо А. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 499. Труды по цитологии и генетике II, 1979, с. 59-73.

Свето- и электронномикроскопически изучались селезенки эмбрионов мышей и кроликов перинатального возраста и новорожденных животных.

Нами охарактеризованы 7 типов стромальных клеток: эндотелиальные клетки синусов и артериол, ретикулярные клетки, фибробласты, дендритные клетки, высокодифференцированные свободные макрофаги, а также оседлые макрофаги с электронноплотными гранулами.

Артериоллярные эндотелиальные клетки находятся в тесном контакте с базальной мембраной, под синусным эндотелием базальная мембрана отсутствует. Фибробласты в селезенке связаны с межклеточными фибриллами и волокнами: вокруг ретикулярных клеток соответствующие структуры отсутствуют. Дендритные ретикулярные клетки отсутствуют в селезенке изученных мышей и их эмбрионах, но они имеются в селезенке кроликов того же возраста. Оседлые макрофаги соответствуют интердигитирующим клеткам кроветворных и лимфоидных органов.

Библ. - 29; рис. - 16.

УДК 576.858.9

Изменение биологических свойств штаммов энтеробактерий под влиянием трансмиссивных R- и Col-плазмид. Таллмейстер Э.Т., Лайдус О.П., Хейнару А.Л. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 499. Труды по цитологии и генетике II, 1979, с. 78-85.

В опытах показано, что некоторые fin^+ и fin^- R-плазмиды совместно с ColIb-плазмидой штамма *Salmonella heidelberg* AIGI вызывают изменения многих биологических свойств штаммов *E. coli* и *Sh. flexneri*. Под влиянием этих R^+ColIb -плазмид затормаживается синтез фермента конверсии β -фенилпропионовой кислоты, бактерии становятся ауксотрофными преимущественно в отношении метионина и неспособными ферментировать сахарозу или мальтозу и продуцировать фимбрий I-го типа, а также изменяются антигенные свойства. В составе R^+ColIb плазмидного комплекса fin^- R-плазида нестабильна и элиминируется из бактериальных клеток.

Для предотвращения ошибок при идентификации выделенных природных микробов следовало бы подвергать все атипичные штаммы энтеробактерий всестороннему изучению на наличие разных плазмид.

Библ. - 35; табл. - I.

О R-, Col- и Hly-плазмидах у штаммов бактерий, изолированных от поросят. Хейнару А.Л., Кирх Р., Таллмейстер Э.Т. - Уч. зап.Тартуского гос. ун-та, вып. 499. Труды по цитологии и генетике II, 1979, с. 106-121.

Изучалось распространение лекарственной устойчивости и R-, Col- и Hly-плазмид у 240 штаммов *E. coli*, выделенных от больных поросят, и 10 штаммов бактерий, изолированных от поверхностей окон и дверей экспериментального свинокombината в ЭССР.

Около одной трети штаммов являлись чувствительными ко всем 6 изученным антибиотикам. Среди 163 резистентных штаммов трансмиссивные R-плазмиды были найдены в 77,9% случаев. Характерными типами R-плазмид являлись R(Tc), R(Sm, Tc) и R(Tc, Nm), хотя всего было выявлено 18 разных типов R-плазмид. Передача R-плазмид в процессе конъюгации во многих случаях характеризуется температурочувствительностью.

Из изученных 250 культур 91 (36,4%) являлась колициногенной. Передача Col-плазмид осуществлялась в 63,5% случаев, а от штаммов, имеющих трансмиссивные R-плазмиды, в 84,6% случаев. Трансмиссивные R- и Col-плазмиды встречаются у штаммов бактерий, изолированных от поверхностей окон и дверей животноводческих ферм.

Гемолитические штаммы *E. coli* встречались в 4,8% случаев. Передача Hly-плазмид осуществлялась совместно с R- и Col-плазмидами.

Выдвигается предположение о возможной передаче R-плазмид во внешней среде как главного фактора их распространения среди разных штаммов энтеробактерий. Предлагается соблюдать на крупных животноводческих фермах такие условия содержания животных, чтобы самозаражение микробами кишечной группы было доведено до минимума, что препятствует распространению вирулентных с R-плазмидами штаммов бактерий.

УДК 547.963

О возможной роли экстрахромосомных элементов в адаптации и в эволюции. Хейнару А.Л. - Уч.зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 499. Труды по цитологии и генетике II, 1979, с. 90-96.

В работе освещаются некоторые спорные вопросы микро- и макроэволюции с точки зрения молекулярной биологии, акцентируется внимание на роли экстрахромосомных элементов в адаптации и в эволюции. Делается вывод о существенной роли плазмид и вирусов в процессе эволюции у про- и эукариотов в связи с парасексуальной миграцией генетической информации. Выдвигается положение, что роль экстрахромосомных элементов у эукариотов связана главным образом с процессом индивидуального развития этих организмов.

Библ. - IIО.

УДК 576.858.9

Возникновение колицинорезистентности у *Escherichia coli* как удобная модель для изучения мутагенного действия. Хейнару А., Метсик Р. - Уч. зап. Тартуского гос. ун-та, вып. 499. Труды по цитологии и генетике II, 1979, с. 128.

В работе представлена методика определения частоты прямых мутаций резистентности к колицинам E2 и B у *E. coli*, которая является высокочувствительной системой и удобной моделью для изучения мутагенного действия различных химических веществ.

Библ. - 6; табл. - I.