

## ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГИБРИДНЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© Н. М. Грезина,<sup>1</sup> П. М. Кленовицкий, Н. А. Зиновьева,  
Е. А. Гладырь, Ю. В. Конопелько, Л. К. Эрнст

*Всероссийский государственный научно-исследовательский институт животноводства РАСХН,  
пос. Дубровицы, Московская обл.;*

<sup>1</sup> электронный адрес: N-Grezina@yandex.ru

Проведены цитогенетические исследования гибридных линий клеток ПО-ЛК-3 (ТК<sup>-</sup>-клетки почки овцы и лимфоциты кролика), БК-ПО ТК<sup>-</sup> (β-клетки кролика и ТК<sup>-</sup>-клетки почки овцы). В обеих клеточных линиях было установлено наличие хромосом как овцы, так и кролика. Модальное число хромосом на 40-м пассаже в клетках ПО-ЛК-3 составляло 121—135 хромосом (40.7 % от исследованных клеток), а в клетках БК-ПО ТК<sup>-</sup> — 106—120 (51.6 %). Клетки ПО-ЛК-3 и БК-ПО ТК<sup>-</sup> идентифицировали в организме животных через 7—28 сут после их введения в семенники и мочку уха подопытных животных трех видов (мышь, кролик и свинья), что свидетельствует о частичной иммунологической толерантности гибридных клеток.

Ключевые слова: гибридные клетки, кариотип, барьер гистонесовместимости.

Принятые сокращения: ГКГ — главный комплекс гистосовместимости, FCS — фетальная сыворотка крупного рогатого скота, IgG — иммуноглобулины класса G, PBS — фосфатно-солевой буфер, ТК<sup>-</sup> — штамм мутантных по тимидинкиназе клеток.

Получение гибридных клеток животных и человека базируется на фундаментальных исследованиях (Okada, 1958; Littlefield, 1964), в которых разработаны методы слияния клеток с помощью вируса Сендай или полиэтиленгликоля и предложены селективные среды для отбора полученных гибридов. Суть методов заключается в получении посредством слияния гетерокарионов, содержащих ядра обоих родительских типов, которые дают начало одноядерным гибридным клеткам.

Такую искусственную гибридизацию можно осуществлять между соматическими клетками животных, принадлежащих к далеким в систематическом отношении организмам, и даже между растительными и животными клетками.

Гибридизация соматических клеток животных сыграла важную роль в исследованиях механизмов реактивации генома покоящейся клетки и степени фенотипического проявления (экспрессивности) отдельных генов, изучении мутаций генов, вызывающих патологические изменения в организме (Besley et al., 1980), выявлении причин злокачественного перерождения клеток и в обнаружении генов устойчивости к различным заболеваниям (Murray et al., 1991). Кроме того, частичную гибридизацию клеток животных и человека можно использовать для определения местоположения хромосомных маркеров ДНК, а также для разработки генных карт (Murray et al., 1991; McClean, 1997).

Гибридные клетки нашли широкое применение в получении моноклональных антител, что долгое время было проблематичным вследствие недолговечности про-

изводящих антитела В-клеток в культуре. Ключом к решению проблемы стало создание гибридов этих клеток с миелоидными клетками (Kohler, Milstein, 1975).

Во Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко (ВИЭВ) на основе немалигнизированных мутантных клеток почки овцы по ТК<sup>-</sup> и лимфоцитов кролика были получены гибридная культура ПО-ЛК-3, нашедшая применение в различного рода вирусологических исследованиях (Дьяконов, 2001), а также продуцирующая инсулин линия клеток БК-ПО ТК<sup>-</sup>, полученная на основе слияния клеток ПО ТК<sup>-</sup> и β-клеток кролика (Шевцова и др., 2004). По данным Дьяконова (1994), гибридные культуры с лимфоцитами животных нетуморогенны, обладают интерферонгенностью.

С целью более полной характеристики особенностей и расширения спектра использования гибридных линий клеток в решении фундаментальных и прикладных проблем биологии и биотехнологии нами было выполнено изучение некоторых цитогенетических и иммунологических особенностей линий клеток ПО-ЛК-3 и БК-ПО ТК<sup>-</sup>.

### Материал и методика

Исследования выполнены на гибридных линиях клеток ПО-ЛК-3 и БК-ПО ТК<sup>-</sup>, выдержавших 40 пассажей после их получения, из коллекции ВИЭВ (предоставлены проф. Л. П. Дьяконовым). Культивирование клеток

проводили в среде Игла с добавлением 5 % FCS, 5 % сыворотки крупного рогатого скота, 2 мМ L-глутамин и антибиотика-антимикотика из расчета 10 мкл/мл, содержащего в 1 мл 10 ИЕ пенициллина, 10 мг стрептомицина и 25 мкг амфотерицина В. По мере нарастания клетки снимали с субстрата после удаления ростовой среды промыванием PBS и обработкой смесью раствора Версена с 0.25%-ным раствором трипсина в соотношении 9 : 1. Клетки выдерживали 3—5 мин при 37 °С до полного открепления, а затем для нейтрализации действия трипсина добавляли ростовую среду, содержащую сыворотку. Коэффициент рассева составлял 1 : 3—1 : 4.

В качестве эталона при анализе хромосомного набора гибридных клеток служили препараты хромосом овцы и кролика, полученные из культуры лимфоцитов, стимулированных к делению конканавалином А в дозе 20 мкг/мл. Дальнейшую обработку препаратов проводили по методу Захарова и соавторов (1982). Получение и обработку хромосомных препаратов гибридных клеток проводили по методике, описанной Дев и Тантравахи (1985), с некоторыми модификациями (Кленовицкий, Грезина, 2004). Препараты окрашивали дифференциально по Гимза с учетом модификаций метода, описанных Захаровым и соавторами (1982).

При кариотипировании гибридных клеток хромосомы объединяли в группы с учетом их видовой принадлежности. Половые хромосомы обоих видов выделяли в самостоятельные группы. Группировку хромосом вели по морфологическим признакам и их рисунку. Каждой из групп присваивали буквенное обозначение.

Выборочно было кариотипировано по 26 клеток из каждой линии. Для определения модального класса клеток по числу хромосом в каждой из исследованных линий было проанализировано не менее 60 метафаз. Для анализа отбирали только клетки, пригодные для точного подсчета хромосом, затем полученные данные объединяли в классы с шагом 15. Объем исследований и величина шага обусловлены высокой вариабельностью числа хромосом в клетках исследуемых культур и наличием большого числа клеток, не пригодных из-за множественных наложений хромосом для точного их подсчета, а также требованием статистического анализа объединять классы, содержащие менее 4 наблюдений (Меркурьева, 1970).

Наличие поверхностных IgG кролика в культуре клеток ПО-ЛК-3, локализующихся в основном на мембранах лимфоцитов животных, определяли методом иммуноцитохимии. С этой целью через 36—48 ч культивирования с клеток сливали ростовую среду, промывали DMEM и фиксировали в течение 15 мин охлажденным метанолом. После удаления метанола клетки промывали PBS и инкубировали с козыми антителами против IgG кролика (разведение 1 : 6000 в PBS) в течение 1 ч при 37 °С. Затем добавляли разведенные в PBS в соотношении 1 : 8000 вторичные антитела против IgG козы, меченные пероксидазой. Для визуализации реакции в качестве субстрата использовали АЕС kit (4 мл бидистиллированной воды, 1 капля перекиси водорода, 2 капли ацетатного буфера и 1 капля хромогена).

С целью определения времени отторжения гибридных клеток при их трансплантации животным различных видов в семенники мышей, кроликов и свиней были введены гибридные клетки обеих линий в количестве 0.5—1.0 млн на семенник (табл. 1). Через 7, 14, 21 и 28 сут из семенников подопытных и контрольных жи-

Таблица 1

## Формирование подопытных групп животных

Вводимые клетки	Животные	Количество голов	Место введения
ПО-ЛК-3	Поросята	8	Семенники
	»	8	Мочка уха
БК-ПО ТК	»	4	Семенники
	»	4	Мочка уха
	Мыши	4	Семенники
	Кролики	4	»
ПО ТК	Поросята	8	»
	»	4	Мочка уха
Лимфоциты кролика	»	4	» »
	»	4	Семенники

вотных была получена первично-перевиваемая культура клеток. Определение наличия гибридных клеток проводили методом ПЦР-анализа ДНК, выделенной из полученной культуры клеток семенника, а также из части семенника реципиента. Для анализа были использованы праймеры к гену бета-лактоглобулина овцы, локализованному на 3-й хромосоме (Cockett et al., 2001). Кроме того, вводили клетки ПО-ЛК-3 в мочку уха поросят. Материал отбирали через 7, 14, 21 и 28 сут после инъекции, выделяли первичную культуру клеток и через 3—4 сут инкубации проводили цитогенетическое исследование.

Идентификацию введенных гибридных клеток в клеточной суспензии, полученной из семенников и образцов мочки уха животных в указанные выше сроки, проводили путем выявления флуоресцирующих клеток в ультрафиолетовом свете под микроскопом после их обработки витальным красителем Hoechst 33342. Для этого клетки наращивали в необходимом количестве, удаляли ростовую среду, промывали PBS, заливали средой DMEM с 2 % FCS и 10 мМ HEPES, дополненной Hoechst 33342 с конечной концентрацией 5 мкг/мл. Окрашивали в течение 30 мин при 37 °С, после чего клетки собирали и в виде суспензии в 0.9%-ном растворе NaCl с 0.4 % глюкозы вводили 2—3-суточным хрячкам в дозе 3—5 млн на семенник и 1—2-недельным поросятам в дозе 1.5—2.0 млн клеток на ухо с последующим периодическим отбором материала и идентификацией инъецированных клеток различными методами.

Для изучения лизирующего действия сыворотки крови человека на гибридные клетки 10 мкл взвеси клеток (около 40 тыс. клеток) инкубировали с 10 мкл сыворотки человека в течение 30 мин при 25 °С, добавляли по 50 мкл низкотоксичной в отношении лимфоцитов человека замороженной сыворотки крови кролика, смесь свежей сыворотки крови 5 мужчин (как источник комплемента) и инкубировали 60 мин при 25 °С, добавляли пропидиум иодид с конечной концентрацией 2 мкг/мл, отмывали и оценивали степень лизиса 5 тыс. клеток методом проточной цитоспектрофлуориметрии. Параллельно в тех же условиях ставили несколько контролей: 1) смесь сыворотки крови примерно 30 человек, не содержащих HLA-антител, инактивированная 30 мин при 56 °С (Neg), с замороженной сывороткой крови кролика, низкотоксичной в отношении лимфоцитов человека

(C rab); 2) C rab с C rab; 3) Neg с Neg; 4) Neg со смесью свежей сыворотки крови 5 мужчин (C hum); 5) C hum с C hum.

Реактивы: AEC Staining kit, Hoechst 33342 (bisbenzimidide), PBS, антибиотик-антимикотик и антитела против IgG козы (Sigma-Aldrich, Германия); L-глутамин, конканавалин А, раствор Версена, среда Игла, сыворотка крупного рогатого скота, трипсин и фетальная сыворотка крупного рогатого скота (ПанЭко, Россия); сыворотка крови кролика (PEL-FREEZ, США); антитела против IgG кролика (ICN Biomedicale, США).

### Результаты и обсуждение

Микроскопические исследования культуры клеток ПО-ЛК-3 показали наличие в основном одного клеточного типа — эпителиоподобных клеток, сходных по морфологии с клетками-партнерами ПО ТК<sup>-</sup>. В культуре БК-ПО ТК<sup>-</sup> обнаружены два типа клеток — круглые и эпителиоподобные с преобладанием последних. По сравнению с мелкими круглыми β-клетками кролика круглые клетки изучаемой гибридной линии характеризуются большими размерами, а эпителиоподобные клетки также сходны с ПО ТК<sup>-</sup>; т. е. в результате гибридизации и последующей селекции гибридные клетки имели морфологию, сходную с таковой клеток почки овцы.

Цитогенетические исследования культур клеток ПО-ЛК-3 и БК-ПО ТК<sup>-</sup> показали наличие в обеих гибридных линиях хромосом овцы и кролика, при этом число хромосом и их состав менялись в процессе культивирования.

Несмотря на то что кариотипы домашней овцы и кролика (рис. 1, 2) различаются по числу входящих в них элементов, морфологическому составу и рисунку хромосом, точная идентификация части средних и мелких гомологичных хромосом в изучаемых линиях клеток оказалась невозможной из-за очень большого числа хромосом. Теоретически сумма хромосом, входящих в кариотипы двух видов, равна 98. Фактически в большинстве клеток этих линий насчитывалось более 110 хромосом, что превышает сумму хромосом, входящих в кариотипы кролика и овцы.

Из литературных данных (Графодатский, Раджабли, 1988) известно, что наиболее пригодными для цитогенетического анализа считаются хромосомы на стадии поздней профазы или ранней метафазы. Однако в нашем случае ранние стадии митоза оказались непригодными для подсчета количества хромосом и кариотипирования клеток из-за большого числа наложений хромосом (рис. 3), поэтому исследования проводили лишь на более поздних стадиях метафазы.

Число хромосом в 71 исследованной метафазной клетке линии ПО-ЛК-3 40-го и в 72 метафазных клетках



Рис. 1. Кариотип самца домашней овцы. 54, XY. Культура лимфоцитов периферической крови. G-окраска.

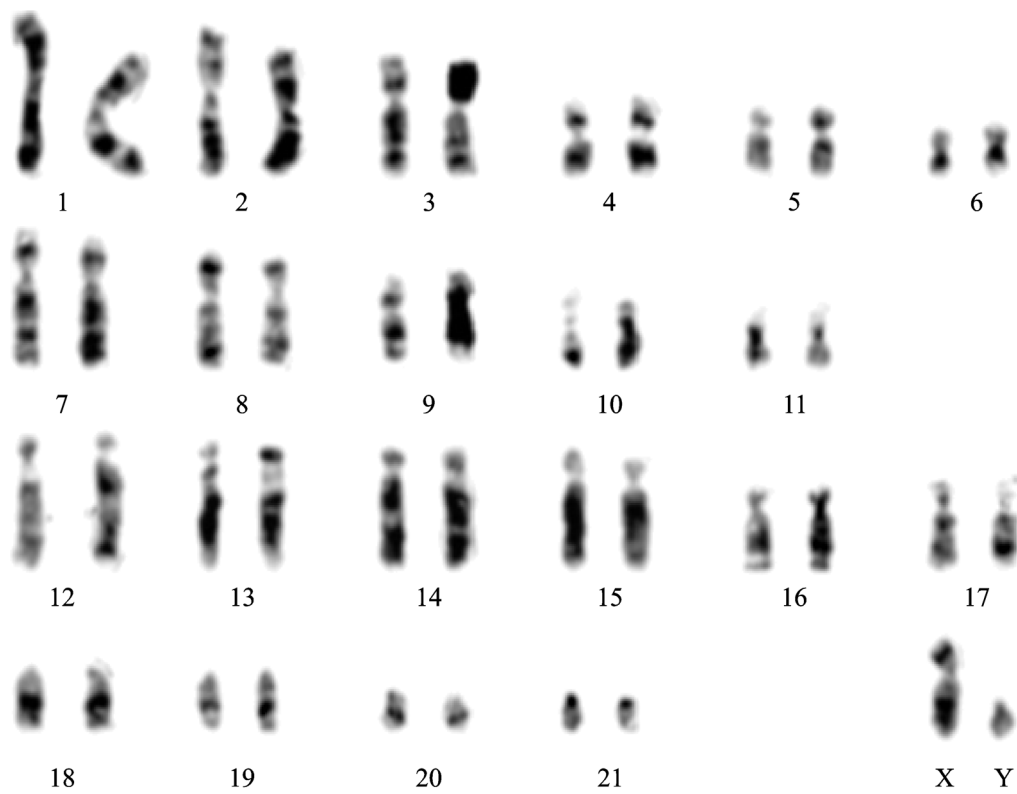


Рис. 2. Кариотип самца домашнего кролика. 44, XY. Культура лимфоцитов периферической крови. G-окраска.



Рис. 3. Делящиеся клетки из культуры ПО-ЛК-3. *а* — метафаза, *б* — ранняя метафаза. Об. 100×, ок. 10×.

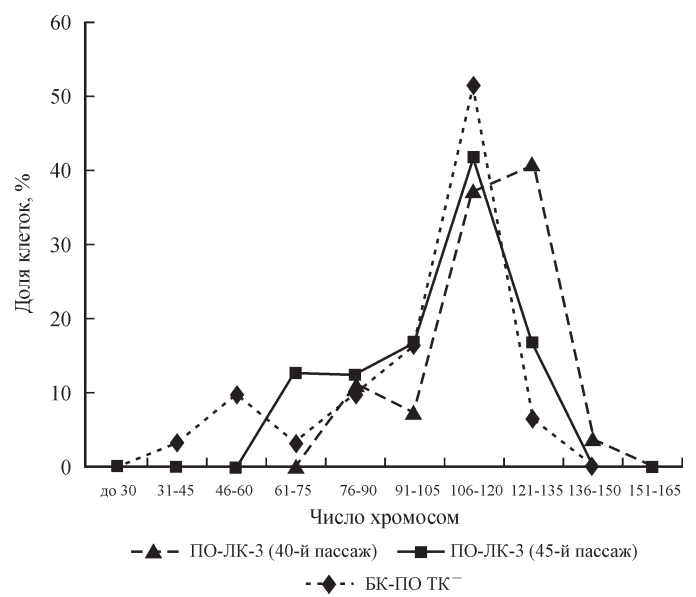


Рис. 4. Распределение клеток с разным числом хромосом в культуре БК-ПО ТК<sup>-</sup> и культурах ПО-ЛК-3 40-го и 45-го пассажей.



Рис. 5. Кариотип гибридной клетки ПО-ЛК-3, 40-й пассаж. G-окраска. Хромосомное число — 116.

*а* — двуплечие хромосомы кролика (30, нулисомия по 11-й 16-й парам); *б* — двуплечие хромосомы овцы (6); *в* — половые хромосомы кролика XY; *г* — половые хромосомы овцы XY; *д* — акроцентрические хромосомы (70; точная идентификация акроцентриков кролика, а также части хромосом овцы в силу их малых размеров затруднена); *е* — дополнительная 5-я или 6-я хромосома кролика; *ж* — aberrantные хромосомы (3).



Рис. 6. Кариотип гибридной клетки БК-ПО ТК<sup>-</sup>. 40-й пассаж. G-окраска. Хромосомное число — 102.

*a* — двуплечие хромосомы кролика (25, нулисомия по 8-й и 17-й парам, моносомия по 5, 11, 12, 13 и 16-й парам); *б* — двуплечие хромосомы овцы (6); *в* — половые хромосомы кролика XY; *г* — половые хромосомы овцы XY; *д* — акроцентрические хромосомы (65, нулисомия по 5-й паре хромосом овцы, моносомия по 6-й паре хромосом кролика и трем парам средних и мелких акроцентриков, точная идентификация акроцентриков кролика в силу малых размеров затруднена).

45-го пассажа варьировало от 88 до 142 и от 71 до 125 соответственно. В первом случае в большинстве клеток (40.7 %) содержалось 121—135 хромосом. С увеличением количества пассажей отмечалась тенденция к снижению числа хромосом в гибридных клетках. Так, среди проанализированных ПО-ЛК-3 45-го пассажа доля клеток со 121—135 хромосомами снижалась до 16.7 %, но при этом 41.7 % клеток характеризовались наличием 106—120 хромосом (рис. 4).

В клетках гибридной линии БК-ПО ТК<sup>-</sup> 40-го пассажа колебание хромосомных чисел составляло от 33 до 124, при этом преобладали клетки с числом хромосом от 76 до 124. Из 62 исследованных клеток 51.6 % имели 106—120 хромосом. Наряду с этим встречались клетки с

уменьшенным числом хромосом от 33 до 75, доля которых в культуре составляла 16.1 % (рис. 4). В клетках с числом хромосом менее 54 (диплоидное число хромосом овцы) наблюдалась утрата большинства хромосом кролика и части хромосом овцы.

Во всех проанализированных клетках четко идентифицировались двуплечие хромосомы обоих видов животных. Но точная идентификация гомологов среди мелких метацентрических хромосом кролика была затруднена. Общее число акроцентрических хромосом было выше, чем сумма одноплечих хромосом обоих видов. Однако на данном этапе исследований не представлялось возможным дифференцировать акроцентрические хромосомы кролика от сходных с ними хромосом овцы.

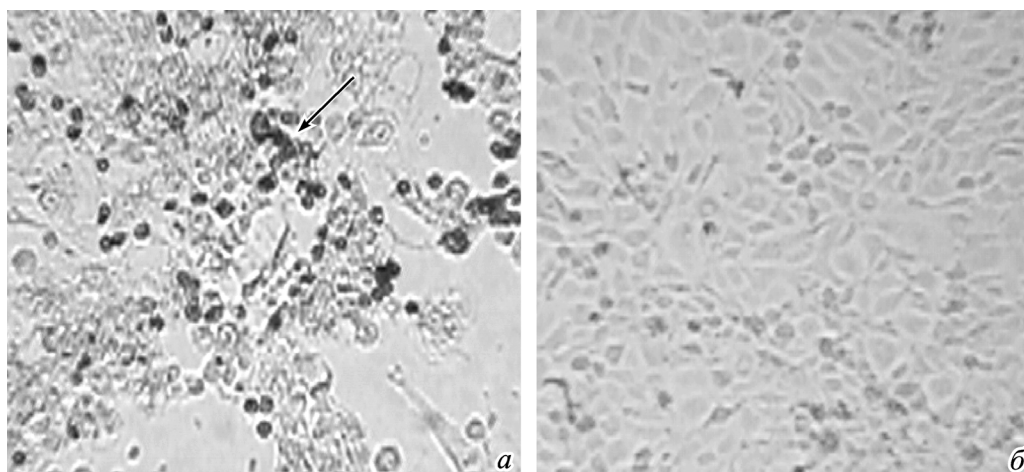


Рис. 7. Культуры клеток, обработанные антителами против IgG кролика.

*a* — первично перевиваемые клетки селезенки; *б* — ПО-ЛК-3. Об. 20×, ок. 10×. Стрелкой показаны положительно окрашенные клетки.

При выборочном кариотипировании клеток ПО-ЛК-3 и БК-ПО ТК было выявлено отсутствие части метацентрических и субметацентрических хромосом кролика, а также некоторых крупных акроцентриков овцы; кроме того, обнаруживались дополнительные акроцентрические хромосомы (рис. 5, 6).

Таким образом, в обеих культурах преобладали клетки с увеличенным по сравнению с суммарным (равным 98) числом хромосом. Для них независимо от источника получения клеток кролика были характерны утрата хромосом кролика и избыток хромосом овцы; эти вариации имели случайный характер.

Таблица 2

## Сохранность различных клеток в организме животных

Вид животного и место инъекции	ПЦР-анализ				Цитогенетические исследования				Флуоресцирующие клетки			
	время после инъекции, сут											
	7	14	21	28	7	14	21	28	7	14	21	28
ПО-ЛК-3												
Поросята семенник мочка уха		+	+	+	-	+	-		+	+	+	-
БК-ПО ТК												
Поросята семенник мочка уха					-		-	-	+	+	+	-
Мыши семенник	+	-	-									
Кролики семенник	+	-	-									
ПО ТК												
Поросята семенник мочка уха	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
Лимфоциты кролика												
Поросята семенник мочка уха	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. «+» — положительный результат, «-» — отрицательный результат, «±» — обнаружены обломки клеток.

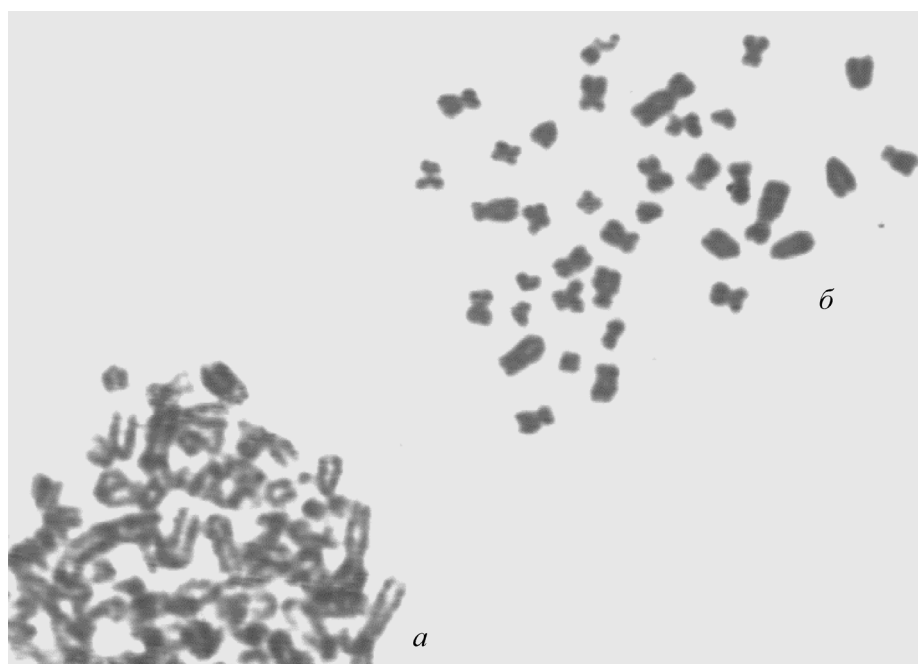


Рис. 8. Хромосомные препараты клеток, выделенных из кожи уха свиньи через 14 сут после инъекции ПО-ЛК-3.  
*a* — фрагмент метафазы гибридной клетки; *б* — метафаза свиньи. Об. 100×, ок. 10×.

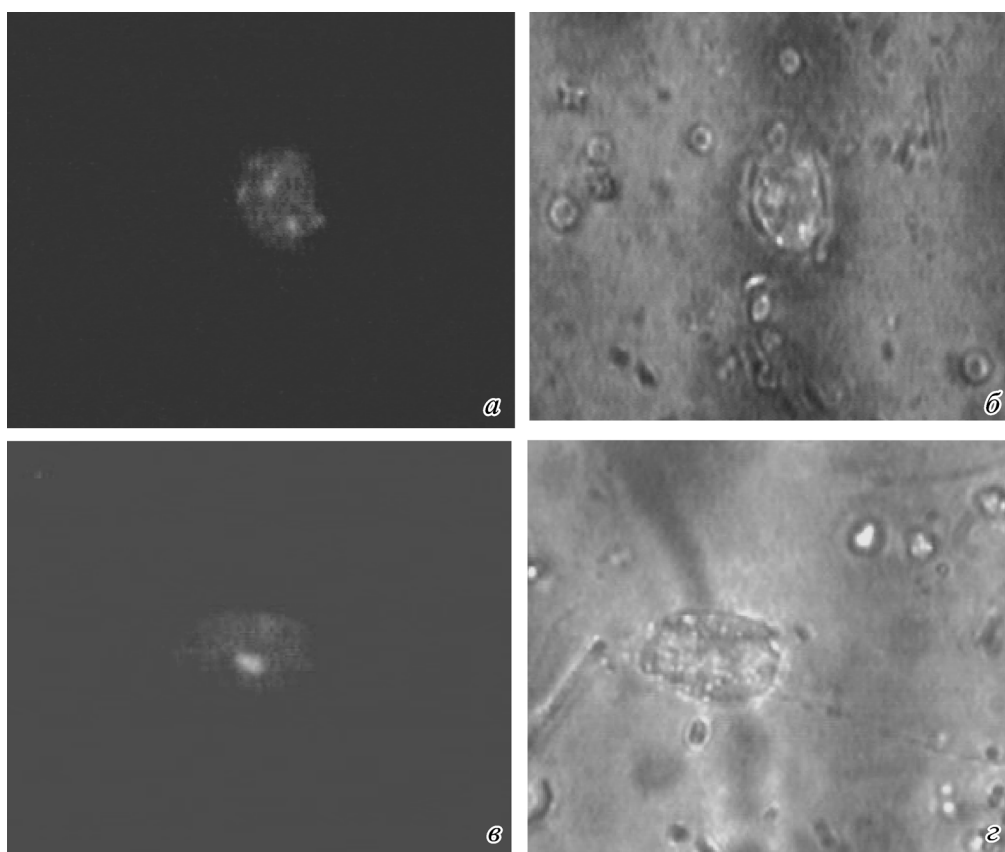


Рис. 9. Гибридные клетки, выделенные из семенников хрячков через 14 сут после введения.  
*a, в* — в ультрафиолетовом; *б, г* — в обычном свете БК-ПО ТК- и ПО-ЛК-3 соответственно. Об. 40×, ок. 10×.



Полученные результаты полностью согласуются с литературными данными о случайном характере потерь хромосом в межвидовых гибридах соматических клеток с преобладанием утраты хромосом какой-либо одной исходной линии (Серов, 1997; Griffiths et al., 2000).

Так как при получении ПО-ЛК-3 одним из партнеров были лимфоциты кролика, проводили иммуноцитохимический анализ гибридной культуры на обнаружение поверхностных IgG кролика, которые локализируются в основном на мембранах лимфоцитов животных (Пол, 1987—1988). При этом в качестве контроля использовали первично-перевиваемую культуру селезенки новорожденного кролика как источник лимфоцитов (Дьяконов, Ситькова, 2000). На рис. 7 видно, что клеток с поверхностными IgG кролика среди ПО-ЛК-3 не выявлено, в то время как в первично-перевиваемой культуре селезенки визуализировались положительно окрашенные лимфоциты. Этот феномен можно объяснить тем, что гибридные клетки в процессе культивирования могут терять хромосомы, в том числе и те, которые содержат гены, кодирующие синтез иммуноглобулинов (Киркин, 1987).

Отсутствие антигенных свойств у гибридных клеток было подтверждено экспериментами *in vivo*. Для этого гибридные и исходные клетки вводили животным (табл. 1) с последующей их идентификацией через 7, 14, 21 и 28 сут.

Инъекции гибридных клеток не приводили к появлению каких-либо внешних реакций (например, раздражения, воспаления и др.) на чужеродные белки. Как видно из данных табл. 2, ПЦР-анализ ДНК, выделенной из семенников хрячков через 14, 21 и 28 сут после трансплантации в них гибридных клеток ПО-ЛК-3, показал наличие ДНК овцы в течение всего экспериментального периода. ДНК овцы обнаруживалась в семенниках кролика и мыши через 7 сут после введения гибридных клеток БК-ПО ТК<sup>-</sup>.

В результате цитогенетических исследований 3—4-суточной культуры клеток, выделенной из мочки уха поросят через 14 сут после инъекции ПО-ЛК-3, помимо метафаз свиньи были обнаружены клетки с характерным для гибридных клеток набором хромосом (рис. 8).

Доля таких клеток составила 27.5 % (11 из 40 исследованных), из них в 8 случаях (72.7 %) на основании анализа кариотипа подтверждена принадлежность этих клеток к линии ПО-ЛК-3. В 3 случаях из-за слабого разброса и большого числа наложений хромосом идентифицировать происхождение клеток, несущих увеличенное число хромосом, не удалось. Число хромосом в гибридных клетках, обнаруженных в культуре, полученной через 14 сут после инъекции их в мочку уха, колебалось от 67 до 112. Доля клеток с числом хромосом 90 и более в этом случае составила 70 %. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что гибридные клетки первые 2 нед действительно не отторгаются организмом животных.

Иммунологическая толерантность гибридных клеточных линий была продемонстрирована еще одним экспериментом. Две линии гибридных клеток и клетки-партнеры (ПО ТК<sup>-</sup> и лимфоциты кроликов), обработанные витальным красителем Hoechst 33342 (в ультрафиолетовом свете с длиной волны 365 нм они обладали ярко выраженной флуоресценцией), были введены в семенники 2—3-суточных хрячков и в мочку уха 1—2-недельных поросят. Исследование первично-трипсинизированных

клеток, выделенных из семенника подопытных животных через 14 сут после введения, показало наличие флуоресцирующих клеток обеих гибридных линий (рис. 9). Исследование контрольных культур, полученных из семенника, в которые были введены исходные клетки — лимфоциты кролика и ПО ТК<sup>-</sup>, не показало наличия флуоресцирующих элементов в первом случае и выявило лишь отдельные светящиеся обломки клеток — во втором (табл. 2).

В первично-перевиваемой культуре, полученной из образцов мочки уха поросят, которым были трансплантированы гибридные и исходные клетки, идентифицировались флуоресцирующие клетки ПО-ЛК-3 и БК-ПО ТК<sup>-</sup> в течение 21 сут после инъекции (табл. 2).

При изучении лизирующего действия сывороток крови человека и кролика на гибридные клетки фоновая гибель (в отсутствие активного компонента) была незначительной и составляла в случае с ПО-ЛК-3 22 %, а в случае с БК-ПО ТК<sup>-</sup> — 12 %, при этом достоверных различий по количеству мертвых клеток среди гибридных и исходных культур получено не было.

Иммунологическую толерантность гибридных клеток можно связать с потерей отдельных хромосом, несущих важные гены, в том числе гены ГКГ, которые у овцы располагаются на 20-й хромосоме (Cockett et al., 2001), а у кролика — на 12-й (Rogel-Gaillard et al., 2001). Этот комплекс генов контролирует синтез антигенов, вызывающих иммунную реакцию отторжения пересаженной ткани. При изучении генетического контроля силы иммунного ответа и особенно при анализе механизмов взаимодействия генетически различающихся клеток был выявлен достаточно широкий спектр биологической активности комплекса. Под контролем ГКГ проходят такие иммунологические процессы, как регуляция силы гуморального (В-клеточного) и клеточного (Т-клеточного) иммунных ответов, обеспечение иммуногенности проникшего в организм антигена, селекция специфических Т-клеток в тимусе (Пол, 1987).

Однако при детальном изучении хромосомных препаратов обеих гибридных линий 12-я хромосома кролика обнаружена во всех клетках с четко визуализируемыми метафазами, 20-ю хромосому овцы в силу ее малых размеров достоверно идентифицировать не удалось. Полученные нами данные указывают на то, что при гибридизации соматических клеток, по всей видимости, снижается барьер гистонесовместимости, что представляет интерес при разработке приемов клеточной терапии.

Выражаем благодарность Л. П. Дьяконову (ВИЭВ) за предоставленные культуры гибридных клеток и В. Ю. Абрамову (Институт трансплантологии и искусственных органов МЗ и МП РФ) за определение лизирующего действия сыворотки крови человека на гибридные клетки.

#### Список литературы

- Графодатский А. С., Раджабли С. И. 1988. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих. Атлас. Новороссийск: Наука. 127 с.
- Дев В., Тантравахи Р. 1985. Методы хромосомного анализа. В кн.: Методы генетики соматических клеток / Под ред. Дж. Шей. М.: Мир. 2 : 572—593.
- Дьяконов Л. П. 1994. Гибридные и генетически трансформированные культуры клеток в биотехнологии и ветеринарной медицине. С.-х. биология. 4 : 4—26—33.

- Дьяконов Л. П. 2001. Клеточная инженерия и генетическая трансформация клеток животных в решении проблем инфекционной патологии и биотехнологии. В кн.: ДНК-технологии в клеточной инженерии и маркировании признаков сельскохозяйственных животных. Дубровицы. 29—39.
- Дьяконов Л. П., Ситькова В. И. 2000. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии). М.: Компания Спутник. 400 с.
- Захаров А. Ф., Бенюш В. А., Кулешов Н. П., Барановская Л. И. 1982. Хромосомы человека. Атлас. М.: Медицина. 254—257.
- Киркин А. Ф. 1987. Методы получения моноклональных антител. Биотехнология. Клеточная инженерия. 3 : 89—123.
- Кленовицкий П. М., Грезина Н. М. 2004. Получение и анализ хромосомных препаратов гибридных клеток. В кн.: Школа-практикум «Методы исследований в биотехнологии сельскохозяйственных животных». Дубровицы. 3 : 46—52.
- Меркурьева Е. К. 1970. Биометрия в селекции и генетике сельскохозяйственных животных. М.: Колос. 423 с.
- Пол У. 1987—1988. Иммунология. М.: Мир. 456 с.
- Серов О. Л. 1997. Перспективы клонирования животных. Вестн. ВОГиС. № 1.
- Шевцова Н. А., Дьяконов Л. П., Гальнбек Т. В., Эрнст Л. К. 2004. Гибридная культура клеток  $\beta$ -клетки кролика  $\times$  почка овцы ТК<sup>-</sup>. В кн.: 4-я Междунар. конф. «Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных». Дубровицы. 93—95.
- Besley G. T., Hoogeboom A. J., Hoogeveen A., Kleijer W. J., Galjaard H. 1980. Somatic cell hybridization studies showing different gene mutations in Niemann—Pick variants. Hum Genet. 54 : 409—412.
- Cockett N. E., Shay T. L., Smit M. 2001. Analysis of the sheep genome. Physical Genomics. 7 : 69—78.
- Griffiths A. J. F., Miller J. H., Suzuki D. T., Lewontin R. C., Gelbart W. M. 2000. An introduction to genetic analysis. 860 p.
- Kohler G., Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256 : 495.
- Littlefield J. W. 1964. Selection of hybrids from mating of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. Science. 145 : 709—710.
- McClellan P. 1997. Human-rodent somatic cell hybrids — mapping human chromosomes. Genomic Analysis.
- Murray J. D., Bowling A. T., Millon L. V., Bowen-Pidgeon D. 1991. Establishment of a somatic cell hybrid panel for the horse. Proc. 7th North American Colloquium on Domestic Animal Cytogenetics and Gene Mapping.
- Okada J. 1958. The fusion of Ehrlich's tumor cells caused by HV virus *in vitro*. Biken's J. 103—110.
- Rogel-Gaillard C., Piumi F., Billault A., Bourgeaux N., Save J. C., Urien C., Salmon J., Chardon P. 2001. Construction of a rabbit bacterial artificial chromosome (BAC) library: application to the mapping of the major histocompatibility complex to position 12q.1.1. Mamm. Genome. 12 : 253—255.

Поступила 17 XI 2005

CYTOGENETIC AND IMMUNOLOGICAL SPECIFICITY  
OF MAMMALIAN HYBRID CELL LINESN. M. Grezina,<sup>1</sup> P. M. Klenovitskiy, N. A. Zinovieva, E. A. Gladyr, Yu. V. Konoplenko, L. K. ErnstAll-Russian State Research Institute of Animal Breeding of the Russian Academy of Agricultural Science,  
Dubrovitsy Settlement, Podolsk District, Moscow Region;<sup>1</sup> e-mail: N-Grezina@yandex.ru

Karyotypes of the hybrid cell lines NS-RL-3 (TK<sup>-</sup>-sheep kidney cells and rabbit lymphocytes) and  $\beta$ CR-NS (TK<sup>-</sup>-rabbit  $\beta$ -cells and TK<sup>-</sup>-sheep kidney cells) were investigated. It was shown that both hybrid cell lines were characterized by presence of both sheep and rabbit chromosomes, which number and structure varies depending on the cell type and the number of passages. In some cases the aberrant chromosomes were identified. It was observed, that 40—50 % of the NS-RL-3 cells survived in culture in the presence of the human blood serum, and also were identified during 7—28 days after their introduction into the organism of the animal. Thus, the partial immunological tolerance of the hybrid cell lines has been suggested.

Key words: hybrid cells, karyotype, a barrier histouncompatibility.