

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

УДК 616-006-018.1-092.9-02:615.277.4

И. И. ПАРХОМЕНКО, Н. П. КОНОВАЛОВА

**ЭФФЕКТ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА КЛЕТОК КАНЦЕРОГЕННЫМИ
УГЛЕВОДОРОДАМИ**

(Представлено академиком Г. М. Франком 27 VII 1971)

Хорошо известно, что культуры нормальных тканей млекопитающих имеют ограниченный период жизни *in vitro*. По истечении определенного числа пассажей резко сокращается количество делящихся клеток, возрастает время генерации, уменьшается эффективность посева и, как правило, культуры дегенерируют (¹, ⁴, ⁵). Инфицирование этих культур онкогенными вирусами вызывает злокачественную трансформацию и стимуляцию роста, выражающуюся в способности к неограниченно долгой жизни *in vitro* (², ⁶). Трансформация нормальных клеток наблюдается также в случае воздействия на них химическими канцерогенами (¹⁰, ¹², ¹³). Однако данных о стимулирующем действии химических канцерогенов на рост нормальных культур в литературе нет.

Настоящая работа посвящена исследованию закономерностей роста клеток первичной хомячковой эмбриональной ткани в норме и после воздействия канцерогенных полициклических углеводов. В опытах использовали клетки хомячка (*mesocricetus auratus*), приготовленные стандартным способом трипсинизации. Культуры выращивали на питательной среде 199 с 10% бычьей сыворотки. В качестве химических канцерогенов были использованы бенз(а)пирен (БП) и 20-метилхолантрен (МХ). Приготовление и работа с канцерогенами были описаны нами ранее (³). Обработку клеток массовой культуры химическими канцерогенами производили на 2—4 сутки после эксплантации клеток в культуру. С целью изучения частоты трансформации производили пассирование клеток по методу Пак (⁷) в среду, содержащую различные дозы химического канцерогена. Клетки находились в контакте с канцерогеном в течение 30—72 час., после чего среда заменялась свежей, содержащей из расчета на чашку $5 \cdot 10^5$ облученных мышинных клеток, служащих в качестве подкормки. Клоны выращивали в течение 15—18 суток в чашках Петри. Культивирование производили в термостате с подачей 5% CO₂ при 37°. На 10 сутки культивирования производили смену питательной среды.

Морфологически трансформированным считали клон, состоящий из хаотического скопления фибробластоподобных или эпителиальных клеток, тогда как нормальный клон растет однослойным ориентированным пластом.

На рис. 1 представлены кривые изменения числа клеток в нормальной культуре и в культурах, обработанных канцерогенами. Как видно из рисунка, количество клеток в нормальной культуре уменьшается со временем, и через 3—4 мес. культивирования, после 6—8 пассажей, культура гибнет (кривая I). В противоположность этому, обработка клеток химическими канцерогенами приводит к прогрессивному росту клеток. Так, в случае применения МХ в дозе 6мг/мл (кривая II) спустя 2 месяца после культивирования наблюдается резкое стимулирование роста и прогрессивное увеличение числа клеток. Так, например, после 45 суток культивирования (4-й пассаж *in vitro*) культура состоит из $4 \cdot 10^6$ клеток, тогда как к 72 суткам (6-й пассаж) число клеток возрастает до $1 \cdot 10^7$

Частота трансформации хомячковой ткани, росшей в присутствии 20-метилхолантрена и бенз(а)пирена

Условия опыта	Колич. пассир. клеток $\times 10^4$	Среднее колич. колоний в чашке	Из общего числа колоний		Эффективность трансформации, %
			норм.	трансформ.	
МХ 6 $\mu\text{г/мл}$, 72 часа	1,5	198	791	0	0
	1,0	82	243	58	17,5
МХ 10 $\mu\text{г/мл}$, 30 час.	1,5	119	477	0	0
	1,0; 2,5	135; 234	364; 656	31; 46	7,6; 6,5
БП 10 $\mu\text{г/мл}$, 72 часа	1,5	213	513	0	0
	4,0	132	519	12	2,3
БП 10 $\mu\text{г/мл}$, 48 час.	1,5	213	513	0	0
	4,0	1143	1124	19	1,6

Примечание. Числа над чертой — контроль, под чертой — опыт.

и т. д. Аналогичные данные получены и при использовании МХ в дозе 15 $\mu\text{г/мл}$ (кривая III). Влияние БП характеризуется довольно продолжительным периодом индукции, в течение которого количество клеток остается постоянным, а затем следует фаза интенсивного увеличения числа клеток (кривая IV). Различия в действии использованных канцерогенов обнаруживаются и при сравнительном исследовании частоты трансформации и онкогенности на взрослых хомячках. Как видно из табл. 1, воздействие на клетки МХ приводит к трансформации 17,5% колоний, в то время как БП в более высоких дозах трансформировал только 2% клеток. Однако следует отметить, что на частоту выхода трансформированных колоний значительное влияние оказывают условия воздействия канцерогена. Так, если МХ в дозе 6 $\mu\text{г/мл}$ в течение 72 час. трансформировал 17,5% клонов, то его более высокие дозы, при меньшей экспозиции, давали выход 7—8% трансформантов.

Причем такие условия воздействия еще не оказывали значительного токсического действия на культуру — не наблюдалось слущивания клеток со стекла.

Культуры, полученные в результате воздействия МХ, были онкогенны для взрослых хомяков. Так, прививка $1 \cdot 10^6$ — $3 \cdot 10^6$ клеток 3 и 4 пассажей (60—65 суток) вызывала у животных рост опухолей. В то же время, тестирование на взрослых животных клеток 4 и 9 пассажей (87 и 331 сутки роста *in vitro*) культуры, полученной в результате воздействия БП в дозе 10 $\mu\text{г/мл}$, дало отрицательные результаты.

Как видно из сказанного, для клеток, подвергшихся воздействию БП, характерен длительный период кризиса, в то же время культуры, подвергшиеся воздействию МХ, не имеют или имеют очень короткую стадию кризиса. Ко 2—3 мес. роста *in vitro* культуры, обработанные МХ, проходят 4—5 пассажей. К этому времени нормальная культура хомячка практически уже полностью дегенерирует. Возможно, что культурам, обработанным БП, для проявления онкогенных свойств *in vivo* и выхода в ста-

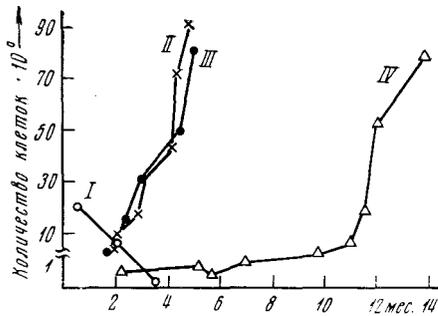


Рис. 1. Рост клеток хомячковой ткани в норме (I) и в результате воздействия МХ в дозе 6 и 15 $\mu\text{г/мл}$ (II и III) и БП в дозе 10 $\mu\text{г/мл}$ (IV)

бильную линию *in vitro* нужен какой-то определенный период времени или, иначе говоря, определенное число клеточных поколений для фиксации трансформированного состояния, как это, например, наблюдали Тодаро и Борека, а также другие авторы в случае трансформации клеток ДНК-содержащими онкогенными вирусами или X-лучами (⁸, ⁹). Наличие длительного периода индукции у культур, обработанных БП, может также объясняться его большей токсичностью.

Таким образом, влияние канцерогенных углеводов на нормальные культуры эмбриональных тканей выражается, помимо злокачественной трансформации, в появлении у клеток способности к длительному культивированию *in vitro* и к выходу в перевивные стабильные линии. Как известно, первичные культуры тканей хомячка чрезвычайно редко превращаются в перевивные линии спонтанно (¹⁰, ¹¹). Выход культур в стабильные линии, по-видимому, всегда связан с приобретением клетками злокачественных свойств и со способностью, в той или иной степени, к трансплантации на гомологичных животных. Полученный в наших опытах с помощью канцерогенных полициклических углеводов эффект стимуляции роста клеток и выхода их в перевивные стабильные линии может являться одним из критериев оценки канцерогенности веществ.

Филiaal Института химической физики
Академии наук СССР
Черноголовка Московской обл.

Поступило
9 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Д. Бершадский, В. И. Гельфонд, Цитология, 14, 2, 423 (1970). ² И. И. Пархоменко, И. С. Ирлиц, Н. П. Коновалова, Вопр. онкол., 15, 47 (1969). ³ И. И. Пархоменко, И. С. Ирлиц, Н. П. Коновалова, Цитология, 11, 242 (1969). ⁴ G. J. Todaro, H. Green, J. Cell Biol., 17, 299 (1963). ⁵ L. Hayflick, Exp. Cell Res., 37, 614 (1965). ⁶ M. Vogt, R. Dulbecco, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 27, 367 (1962). ⁷ T. Puck, P. J. Marcus, S. J. Cieciura, J. Exp. Med., 103, 273 (1955). ⁸ G. J. Todaro, H. Green, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 55, 302 (1966). ⁹ C. Borek, L. Sacks, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 59, 83 (1968). ¹⁰ Y. Berwald, L. Sacks, J. Nat. Cancer Inst., 35, 641 (1965). ¹¹ A. Sivak, B. L. Van Duuren, Exp. Cell Res., 49, 572 (1968). ¹² Y. Berwald, L. Sachs, Nature, 200, 1182 (1963). ¹³ S. Mandel, C. Heidelberger, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 65, 1, 219 (1970).