

В. И. ГЕЛЬФАНД

## ОБРАТИМАЯ РЕВЕРСИЯ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ БЕССЫВОРОТОЧНОЙ СРЕДЫ

(Представлено академиком А. С. Спириным 12 XI 1973)

Известно, что под действием онкогенных вирусов и химических канцерогенов нормальные клетки могут подвергаться неопластической трансформации. Трансформированные клетки обладают, как правило, характерными признаками, способными исчезать в определенных экспериментальных условиях, — реверсия неопластической трансформации. Изучение этого явления интересно для выяснения механизмов, определяющих нормальное или трансформированное состояние клетки. В данной статье описывается новый тип реверсии, удобный для экспериментального анализа.

Работа проведена на линии клеток LSF, которая является сублинией известной малигнизированной линии L <sup>(1)</sup>. Клетки LSF получены нами из клеток L путем адаптации к культивированию в среде без сыворотки. Мы показали, что клетки LSF могут в зависимости от наличия сыворотки в среде находиться в одном из двух состояний: при культивировании в среде с сывороткой — в более трансформированном, а при культивировании в среде без сыворотки — в более нормальном состоянии. В качестве критериев трансформации мы выбрали: а) способность клеток агглютинироваться растительными агглютиназинами конканавалином А (Con A) <sup>(2)</sup> и агглютинином из зародышей пшеницы (WGA) <sup>(3)</sup>; б) способность метаболизировать канцерогенный углеводород бенз(а)пирен (БП) <sup>(4)</sup>; в) чувствительность клеток к токсическому действию БП <sup>(5)</sup>; г) способность клеток расти в суспензии в среде, содержащей метилцеллюлозу <sup>(6)</sup>.

Клетки LSF культивировались в среде без сыворотки, содержащей равные объемы среды Игла и 0,5% раствора гидролизата лактальбумина. Адаптация проводилась в 2 этапа. Первый этап состоял в культивировании клеток на «кондиционированных» флаконах, на которых перед этим росли обычные клетки L. Клетки эти удаляли трипсином, флаконы промывали средой без сыворотки и на них помещали клетки LSF. Через 6 пассажей культуры начали рассаживать на чистые флаконы, причем до 15-го пассажа их пересеивали трипсином, а далее раствором ЭДТА. Морфология клеток LSF при редком засеве сходна с морфологией исходных клеток L. Оба типа клеток имеют полигональную, иногда вытянутую форму, значительная их доля обладает длинными отростками. Исследование в сканирующем микроскопе показало, что на поверхности клеток имеются многочисленные микроворсинки. Добавление в среду сыворотки почти не меняет морфологию культуры, при этом лишь несколько уменьшается число клеток, обладающих длинными отростками. Сыворотка не вызывает изменения скорости роста культур (рис. 1). Даже после 1 мес. культивирования в среде с сывороткой клетки не теряют способности к росту при переносе в бессывороточную среду.

Агглютинация клеток Con A и WGA проводилась в основном по методике Бургера <sup>(3)</sup>. По окончании инкубации подсчитывали в камере Горяева число клеток, находящихся в агрегатах, и число одиночных клеток. Результаты опыта выражали индексом агглютинации, который вычислялся по следующей формуле:

$$\text{и.а.} = [A(D) - A(0)] / E(0),$$

где и.а. — индекс агглютинации,  $A(D)$  — число клеток в агрегатах при данной дозе агглютина,  $A(0)$ ,  $E(0)$  — число клеток в агрегатах и одиночных клеток в отсутствие агглютина. Соответственно чем больше и.а., тем сильнее агглютинация, и.а.=1 соответствует полной агглютинации, и.а.=0 — отсутствию агглютинации. Как и другие трансформированные клетки (<sup>2, 3</sup>), клетки L агглютинируются Con A и WGA лучше, чем нормальные.

Подобно клеткам L, клетки LSF, культивировавшиеся в течение 3 суток в среде с сывороткой, хорошо агглютинируются Con A и WGA, тогда как при росте в среде без сыворотки их и.а. примерно такой же, как у нормальных клеток (табл. 1). Повышение агглютинативности клеток LSF после переноса в среду с сывороткой происходит между 6-м и 24-м часом, причем агглютинацию можно вновь понизить, поместив клетки в бессывороточную среду (табл. 2). Существенно, что исходные клетки L даже после 3 суток инкубации в бессывороточной среде не снижали агглютинацию под действием Con A.

Одним из признаков, отличающих нормальные клетки от клеток L, является их способность к метаболизму БП. Если нормальные клетки интенсивно разрушают БП, добавленный в культуральную среду, то клетки L лишены такой способности (\*). Для определения метаболизма БП у клеток LSF их рассевали во флаконы Карреля в 5 мл среды. Одновременно с рассадкой вносили БП в виде раствора в диметилсульфоксиде (ДМСО).

Концентрация БП составляла 0,1 мкг/мл, конечная концентрация ДМСО не превышала 0,5%. После 3—4 суток инкубации БП из клеток и культуральной среды экстрагировали октаном и определяли спектрально-флуоресцентным методом (<sup>7</sup>). В табл. 3 приводятся данные по метаболизму БП клетками. Оказалось, что в среде с сывороткой клетки LSF не разрушают БП, тогда как в среде

без сыворотки они метаболизируют его, хотя и не так интенсивно, как нормальные мышинные эмбриональные клетки.

Известно, что нормальные фибробласты грызунов более чувствительны к токсическому действию некоторых канцерогенов, чем трансформированные (<sup>5</sup>). Мы исследовали чувствительность клеток LSF к токсическому действию БП. Оказалось, что вплоть до очень высоких концентраций (6 мкг/мл) БП не токсичен для клеток LSF при инкубации в течение 3 суток, независимо от того, в какой среде клетки растут, с сывороткой

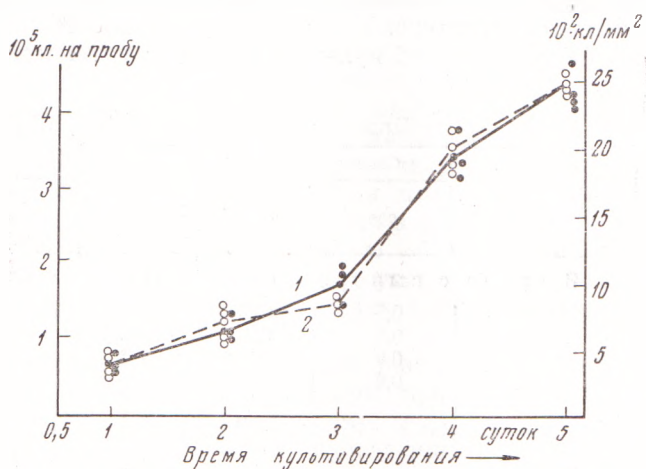


Рис. 1. Изменение количества клеток LSF при культивировании. 1 — LSF с сывороткой, 2 — без сыворотки

Таблица 1

Индекс агглютинации клеток L, LSF и мышинных эмбриональных клеток (м.э.) Con A и WGA

Клетки	Среда	Con A (мкг/мл)		WGA (мкг/мл)	
		200	40	200	40
М.э.	С сывороткой	0,3	0	0,4	0,1
L	»	0,9	0,6	0,9	0,8
LSF	»	0,8	0,5	0,9	0,6
LSF	Без сыворотки	0,4	0,1	0,4	0,1

или без нее. БП не меняет также морфологию клеток LSF. Следовательно, метаболизм БП у клеток LSF не приводит к появлению токсичного производного канцерогена и потому, скорее всего, отличается от метаболизма у нормальных клеток.

Условием, необходимым для размножения нормальных фибробластоподобных клеток *in vitro*, является прикрепление их к твердой подложке<sup>(8)</sup>. Многие трансформированные клетки<sup>(8)</sup> способны размножаться в суспензионной культуре. Мы исследовали влияние сыворотки на рост клеток LSF в суспензионной культуре в среде с метилцеллюлозой. Оказалось, что

Таблица 2  
Индекс агглютинации клеток LSF ConA

Время инкубации, час	ConA (мкг/мл)		Время инкубации, час	ConA (мкг/мл)	
	200	40		200	40
В среде с сывороткой			В среде без сыворотки		
0	0,5	0,2	0	0,9	0,7
6	0,6	0,2	0,5	0,8	0,7
24	0,9	0,5	1	0,8	0,5
96	0,9	0,5	3	0,8	0,5
			6	0,6	0,2
			24	0,4	0,1

после 6 суток культивирования число колоний, состоящих более чем из 1 клетки, значительно выше у клеток LSF, инкубированных с сывороткой, чем у клеток, растущих без нее ( $72 \pm 10\%$  колоний у клеток L,  $2 \pm 1\%$  у мышинных эмбриональных клеток,  $67 \pm 5\%$  у LSF в среде с сывороткой и  $10 \pm 5\%$  у LSF в среде без сыворотки). Эти данные свидетельствуют о различии в числе клеток, способных образовывать колонии, а не о разной скорости роста, так как увеличение срока инкубации не уменьшает долю колоний, состоящих лишь из одной клетки. Кроме того, разница в скорости роста клеток LSF в монослойной культуре с сывороткой и без нее незначительна. Клетки LSF в суспензионной культуре без сыворотки сохраняют жизнеспособность, так как добавление сыворотки вызывает увеличение числа многоклеточных колоний, а также увеличение среднего размера колоний.

Итак, в нашей работе описан штамм клеток LSF, полученный адаптацией трансформированных клеток L к культивированию в бессывороточной среде и обладающий рядом признаков, характерных для нормальных клеток. Отличия линии LSF от клеток L исчезали, если культивирование проводили в среде с сывороткой. Таким образом, клетки LSF могут в зависимости от условий роста поддерживаться в «трансформированном» или

Таблица 3  
Метаболизм БП мышинными эмбриональными клетками L и LSF

Клетки	Среда	Неизмененный БП после 72 час. инкубации (мкг/флакон)	Неизмененный БП (% от внесенного)
М.э.	С сывороткой	$0,04 \pm 0,01$	$8 \pm 2$
L	»	$0,44 \pm 0,01$	$90 \pm 2$
LSF	»	$0,40 \pm 0,04$	$90 \pm 8$
LSF	Без сыворотки	$0,14 \pm 0,02$	$28 \pm 4$

«нормальном» состоянии. Реверсия клеток LSF не была, однако, полной, так как, например, морфология клеток и их чувствительность к токсическому действию БП при переносе в среду без сыворотки не менялись. До сих пор ревертанты можно было разделить на две группы: линии, полученные отбором, стойко сохраняющие свои свойства в отсутствие фактора, вызвавшего отбор<sup>(9-10)</sup>, и линии, «нормализующиеся» под действием того или иного фактора и сохраняющие свои свойства лишь в присутствии этого фактора. У ревертантов, относящихся к первой группе, трудно



индуцировать переход из «нормального» состояния в «трансформированное» и, тем самым, невозможно изучать культуры, имеющие одно происхождение, а также кинетику «нормализации» тех или иных признаков. Ко второй группе можно отнести различные линии клеток, «нормализующиеся» под действием  $N^6, O^{2'}$ -дибутирилциклического АМФ (<sup>11</sup>), а также линию клеток нейробластомы С 1300, клетки которой в среде с сывороткой активно размножаются, а при переносе в среду без сыворотки перестают делиться и начинают дифференцироваться в типичные нейроны (<sup>12-14</sup>). У этой группы ревертантов «нормализация» сопровождается значительным замедлением темпов размножения клеток, что исключает продолжительное культивирование клеток в «нормальном» состоянии, а в некоторых случаях даже ставит вопрос о том, не является ли «нормализация» результатом токсического действия нормализующего фактора. Описанная нами система не обладает указанными выше недостатками. Переход ряда признаков клетки из одного состояния в другое индуцируется простым изменением состава среды и полностью обратим. Это позволяет надеяться, что полученная линия может стать удобным объектом для изучения факторов, определяющих и поддерживающих нормальное состояние отдельных клеточных свойств.

Автор выражает благодарность Ю. М. Васильеву за помощь в морфологических исследованиях и ценные советы при проведении работы, М. Бургеру — за препарат WGA, Г. А. Белицкому, А. Д. Бершадскому, Л. А. Лясс и А. Я. Хесиной — за помощь в проведении ряда экспериментов.

Институт белка  
Академии наук СССР  
Пушкино-на-Оке

Поступило  
12 XI 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> W. R. Earle, J. Nat. Cancer Inst., v. 3, 5, 555 (1943).    <sup>2</sup> M. Inghbar, L. Sachs, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 63, 4, 1418 (1969).    <sup>3</sup> M. M. Burger, A. R. Goldberg, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 57, 2, 359 (1967).    <sup>4</sup> L. A. Andrianov, G. A. Belitsky et al., Brit. J. Cancer, v. 21, 2, 566 (1967).    <sup>5</sup> V. B. Starikova, Yu. M. Vasiliev, Nature, v. 195, 4836, 42 (1962).    <sup>6</sup> M. Stoker, Ch. O'Neill et al., Int. J. Cancer, v. 3, 5, 683 (1968).    <sup>7</sup> T. E. Федосеева, А. Я. Хесина, Журн. прикл. спектроскопии, 2, 282 (1968).    <sup>8</sup> I. Macpherson, L. Montagnier, Virology, v. 23, 1, 291 (1964).    <sup>9</sup> Z. Rabinowitz, L. Sachs, Nature, v. 220, 5173, 1203 (1968).    <sup>10</sup> R. E. Pollack, H. Green, G. J. Todaro, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 60, 1, 126 (1968).    <sup>11</sup> G. S. Johnson, R. M. Friedman, I. Pastan, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 185, 413 (1971).    <sup>12</sup> G. Augusti-Tocco, G. Sato, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 64, 2, 311 (1969).    <sup>13</sup> A. Blume, F. Gilbert et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 67, 3, 786 (1970).    <sup>14</sup> D. Schubert, S. Humphreys et al., Developmental Biol., v. 25, 2, 514 (1971).