

УДК 576.858.6:576.3-085:599.82

МОРФОЛОГИЯ

Академик АМН СССР Б. А. ЛАПИН, В. З. АГРБА, Л. А. ЯКОВЛЕВА,
И. А. САНГУЛИЯ, В. В. ТИМАНОВСКАЯ, Г. Н. ЧУВИРОВ,
Л. В. КОКОША

**ПОЛУЧЕНИЕ СУСПЕНЗИОННЫХ ЛИМФОБЛАСТОИДНЫХ
КУЛЬТУР КЛЕТОК, СОДЕРЖАЩИХ ГЕРПЕСОПОДОБНЫЙ ВИРУС,
ИЗ КРОВЕТВОРНЫХ ОРГАНОВ ПАВИАНОВ ГАМАДРИЛОВ
БОЛЬНЫХ ГЕМАТОСАРКОМОЙ**

В последние годы широко обсуждается роль вирусов группы герпеса в возникновении некоторых опухолевых заболеваний человека и животных. К настоящему времени показана способность вирусов этой группы индуцировать опухоли у ряда животных, а также доказана этиологическая роль вирусов из группы герпеса в возникновении злокачественных лимфом у цыплят и индеек (^{2, 4, 5, 9-11}). Чрезвычайно важным является то, что при одной из человеческих опухолей — злокачественной лимфоме Беркитта — в культурах клеток опухоли закономерно выделяется вирус герпеса, названный EBV (³). Вирус трансформирует клетки приматов и индуцирует злокачественные опухоли у некоторых видов обезьян (^{5, 6, 9, 11}). Накапливаются данные о возможной этиологической роли вирусов группы герпеса при пазофарингеальном раке и раке шейки матки человека (^{8, 12}).

В связи с вышесказанным имеет большое значение регулярное обнаружение и размножение вируса герпеса в полученных нами суспензионных лимфобластоидных перевивных линиях клеток из кроветворных тканей павианов гамадрилов, болеющих гематосаркомой (злокачественной лимфомой).

Материалом для культивирования служили костный мозг и селезенка 4-х павианов, забитых в связи с гематосаркомой. Клетки костного мозга обезьяны № 9387, селезенки обезьян №№ 9386, 9363, 11760 и 4216 культивировались на среде RPMI 1640 с 20% инактивированной прогреванием бычьей эмбриональной сывороткой и инкубировались при 37° в газовой смеси (95% воздуха и 5% CO₂).

Клетки костного мозга обезьяны № 9386 в течение 2,5 мес. культивирования представляли мноморфную культуру фибробластов, образующих монослой на стекле культуральных флаконов. Позже на поверхности монослоя фибробластов начали формироваться и накапливаться округлые клетки, расположенные группами и одиночно (рис. 1а). Монослой при этом деформировался, фибробласты местами теряли четкие контуры. Округлые элементы и группы их отрывались от поверхности пласта фибробластов и плавали в суспензии. Будучи перенесенными в свежие флаконы, они размножались в жидкой фазе без признаков прикрепления к стеклу, достигая плотности равной 2—3·10⁶ клеток в 1 мл. Время удвоения количества клеток составляло 18—20 час., процент живых клеток колебался в пределах 85—96%. Эта суспензионная культура была названа КПМГ-1. Наблюдение в течение 10 мес. за флаконами, в которых на поверхности фибробластического пласта происходило формирование суспензионной культуры показало, что в этих флаконах постоянно происходит пролиферация клеток обоих типов. Пролиферация элементов в суспензии идет активнее, что выражается в большом урожае суспензионных клеток по сравнению с фибробластами. На окрашенных по Романовскому-Гимза

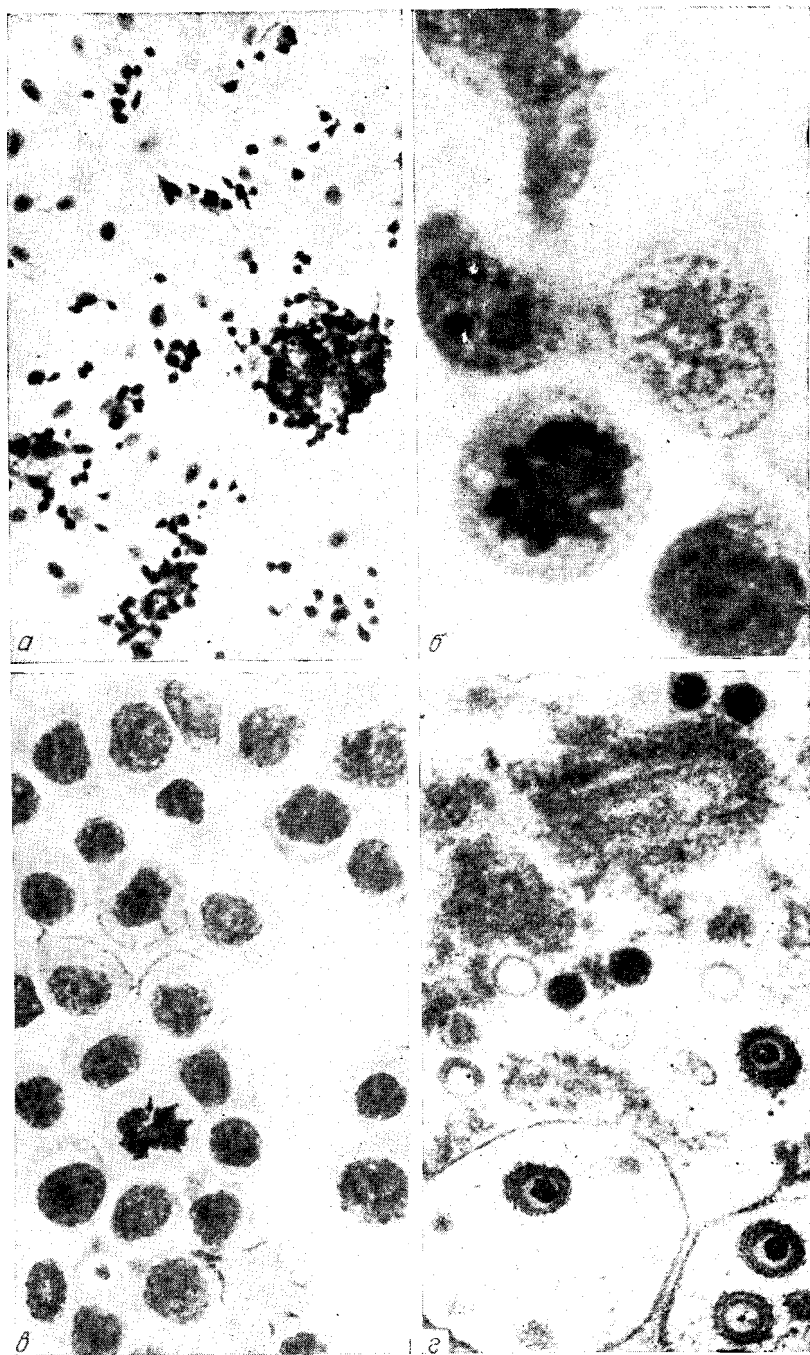


Рис. 1. *а* — размножение круглоклеточных элементов в культуре клеток КМПГ-1 на слое фибробластов. 100 \times . *б* — связь размножающихся округлых клеток, переходящих в суспензию, с фибробластами монослоя. 1200 \times . *в* — пролиферирующие бластные клетки суспензии клеток культуры СПГ-4. 500 \times . *г* — зрелые и незрелые вирусные частицы типа герпес в клетке культуры КМПГ-1. Ультратонкий срез. 100000 \times . *а-в* — окраска по Романовскому — Гимза

препаратах этой культуры можно проследить взаимосвязь округлых клеток и фибробластических с образованием цитоплазматических мостиков (рис. 16).

Исходная популяция клеток селезенки обезьян №№ 9386, 9363, 11760 и 4216 была смешанной и с самого начала культивирования представляла смесь лимфоидных элементов, присутствующих в жидкой фазе и фибробластических клеток, растущих на твердом субстрате. Через 1 мес. культивирования клеток селезенки обезьян № 9386, 9363, 11760 и 20 дней культивирования клеток селезенки обезьяны 4216 ростовые преимущества получили лимфоидные элементы, что выражалось в их активной пролиферации в культуральной жидкости. Фибробластические элементы при этом полностью элиминировались. Сформировавшиеся селезеночные суспензионные культуры были обозначены СПГ-1 (клетки селезенки обезьяны 9386), СПГ-2 (клетки селезенки обезьяны 9363), СПГ-3 (клетки селезенки обезьяны 11760) и СПГ-4 (клетки селезенки обезьяны 4216). Перечисленные суспензионные культуры пролиферируют приблизительно с одинаковой активностью. Время удвоения клеток составляет в среднем 20—24 часа. Процент живых клеток колеблется в пределах 80—91%.

Морфологически клетки всех 5 суспензионных культур (КМПГ-1, СПГ-1, СПГ-2, СПГ-3, СПГ-4) представлены элементами лимфоидного типа, сходными с малодифференцированными бластными клетками кровеносных органов (рис. 1в).

При многократном электронномикроскопическом исследовании ультратонких срезов культур КМПГ-1, СПГ-1, СПГ-2, СПГ-3, СПГ-4 показано, что 1—16% клеток содержали вирусные частицы типа герпес (рис. 1г). Незрелые вирусные частицы размером 70—75 нм выявлялись в ядре и цитоплазме клеток. Зрелые вирусные частицы диаметром 110—120 нм располагались в межклеточном пространстве и в канальцах эндоплазматического ретикулума. Электронноплотный нуклеоид диаметром 40—45 нм был расположен эксцентрично.

Опыты по заражению мозга однодневных кроликов и сосунков хомяков экстрактом клеток КМПГ-1 дали отрицательные результаты. При кокультивировании клеток культур КМПГ-1, СПГ-2, СПГ-3 и СПГ-4 с первично-трипсицинизированными культурами клеток почки эмбриона кролика, тимуса павиана гамадрила и перевиваемыми культурами Vero и HF не было выявлено ни цитопатического действия, ни трансформации, ни скрытого размножения вируса. Вышеизложенное позволяет утверждать, что выделенный вирус не относится к группе Herpes simplex (¹). Идентификация вируса герпеса, выделенного от больного гематосаркомой павианов гамадрилов (обозначенного ГВП) проводилась в тесте непрямой иммунофлюоресценции. Иммуной сывороткой служила сыворотка больного лимфомой Беркитта человека: содержащая антитела к капсидному антигену EBV (²). Одновременно с клетками культур КМПГ-1, СПГ-1-4 исследовались клетки культуры В-95-8, представляющие лимфоциты обезьяны игрунки *in vitro* трансформированные EBV вирусом (³). В качестве контроля исследовались клетки культуры фибросаркомы шерстистой обезьяны (SSV-1), продуцирующие онкорнавирус типа «С». Контролем служили также клетки монослойной перевиваемой культуры костного мозга *M. arcoides* с экспериментальной злокачественной лимфомой (КММБ-1), продуцирующие онкорнавирус типа «С». Культура получена в Институте экспериментальной патологии терапии АМН СССР. Кроме того как контроль использовались клетки монослойной культуры Cf₂TR BILN (перевивная линия тимоцитов собаки, кокультивированная с клетками лимфосаркомы павиана гамадрила), также продуцирующие «С» частицы.

Гранулярная цитоплазматическая флюоресценция определялась в 1—6% клеток исследуемых суспензионных культур КМПГ-1, СПГ-2, СПГ-3, СПГ-4, а также в 3—5% клеток культуры В-95-8. В клетках контрольных культур в реакции с той же сывороткой флюоресценция на обнару-

живалась. Полученные результаты свидетельствуют о сходстве ГВП, ассоциированного с клетками КМПГ-1, СПГ-2, СПГ-3, СПГ-4 с вирусом EBV. Для определения принадлежности лимфоидных клеток культур к «В» или «Т» типу проводилось их исследование в реакции иммунофлюоресценции с сывороткой против иммуноглобулинов человека, а также ставилась реакция образования розеток клетками культуры с эритроцитами барана. Установлено, что клетки культуры содержат иммуноглобулины и не формируют розеток. Вышеизложенное позволяет отнести клетки культуры к «В» типу (6).

Таким образом, из клеток костного мозга и селезенки больных гематосаркомой (злокачественной лимфомой) павианов гамадрилов получены перевиваемые суспензионные лимфобластоидные культуры клеток и выделен вирус герпеса, который по биологическим и иммунологическим свойствам сходен с вирусом Эпштейн — Барр (EBV), изолированным из клеток злокачественной лимфомы человека.

Институт экспериментальной патологии и терапии
Академии медицинских наук СССР
Сухуми

Поступило
16 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. М. Жданов, С. Я. Гайдамович, Вирусология, М., 1966, стр. 433. ² P. M. Biggs, Marek's Disease and Avian Leukoses. XI Intern. Cancer Congress, Florence, 1974, p. 125. ³ M. A. Epstein, B. G. Achong, Y. M. Barr, Lancet, v. 1, 702 (1964). ⁴ M. A. Epstein, R. D. Hunt, H. Rabin, Intern. J. Cancer., v. 12 309 (1973). ⁵ L. A. Falk, G. Lauren, Federat. Proc., v. 33, № 3, Part 1 (1974). ⁶ L. Falk, L. Wolfe, Intern. J. Cancer, v. 13, 363 (1974). ⁷ G. Henle, W. Henle, J. Bacteriol., v. 91, 1248 (1966). ⁸ W. Henle, G. Henle, Intern. Symp. of Comp. Leukemia Res., Basel, 1971, p. 706. ⁹ R. D. Hunt, L. V. Melendez, J. Nat. Cancer Inst., v. 44, 447 (1970). ¹⁰ L. V. Melendez, R. D. Hunt et al., Lab. Anim. Care, v. 19, 378 (1969). ¹¹ L. V. Melendez, R. D. Hunt, Federat. Proc., v. 31, 1643 (1972). ¹² W. E. Rowls, W. A. Towkins, J. L. Melnik, Am. J. Epidem., v. 89, 547 (1969).