

Действительный член АМН СССР Б. А. ЛАПИН, В. З. АГРБА,
А. Г. ДЬЯЧЕНКО, Л. А. ЯКОВЛЕВА, П. А. САНГУЛИЯ,
Л. В. КОКОША, Г. Н. ЧУВИРОВ, В. В. КАКУБАВА

**ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ
ЛИМФОБЛАСТОИДНОЙ КУЛЬТУРЫ, ПОЛУЧЕННОЙ ОТ
БОЛЬНОГО ЛИМФОГРАНУЛЕМАТОЗОМ, ВИРУСА ТИПА
ЭПСТАЙН — БАРР**

С 1964 г., когда впервые была обнаружена связь вируса типа герпеса со злокачественной лимфомой человека ⁽¹⁾, исследования в этой области все время расширяются. Хорошо известна связь вируса Эпстайн — Барр (ЭБВ) с такими заболеваниями человека, как рак носоглоточного пространства, лимфома Беркитта, и таким вполне доброкачественным заболеванием, как инфекционный мононуклеоз ⁽²⁻⁴⁾. В этой связи значительный интерес вызывают сообщения о случаях обнаружения вируса типа герпеса при опухолевых заболеваниях человека. Настоящее сообщение посвящено выделению вируса типа Эпстайн — Барр из клеток суспензионной культуры, названной ЧСЛ-1 и полученной из опухолевого материала человека, больного лимфогранулематозом.

Культивированию подвергали кусочки опухоли больного Ч. 69 лет, госпитализированного с диагнозом: лимфогранулематоз, преимущественно локальная форма, смешанноклеточный вариант. Питательной смесью служила среда RPMI 1640 в сочетании с 20% инактивированной прогретым бычьей эмбриональной сыворотки. Инкубирование проводили при 37° в термостате с газово-воздушной смесью, состоящей из 95% воздуха и 5% CO₂, и в термостатированном встряхивающем аппарате фирмы New Brunswick Sci Co при скорости встряхивания 80 циклов/мин, а также в термальной комнате при пониженной температуре (35°).

Через 6 дней после начала культивирования было отмечено наличие островков фибробластоподобных клеток на стекле культуральных флаконов. Округлые клетки разных размеров занимали пространство и между этими островками, и находились во взвешенном состоянии. Такая смешанная популяция клеток наблюдалась в течение 35—40 дней культивирования. Причем в начальный период культивирования фибробластоподобные клетки доминировали и образовывали монослой, на поверхности которого располагались клетки округлой формы. После 35—40 дней культивирования количественное преимущество получили клеточные элементы округлой формы, которые накапливались на поверхности слоя фибробластоподобных клеток. Затем в течение 3—4 мес. в одних и тех же флаконах постоянно происходило образование и накопление клеток обоих типов. Наилучшие результаты были получены при культивировании клеток ЧСЛ-1 в атмосфере 5% CO₂ или при условии постоянного встряхивания при 37°. При этом плотность клеточной массы и процент мертвых клеток находились приблизительно на одном уровне (рис. 1).

На окрашенных по методу Гимза — Романовского препаратах, приготовленных в первые дни культивирования, клетки были представлены лимфоцитами, лимфобластами и эозинофилами. Морфология уже сформированной культуры ЧСЛ-1 носила более однородный характер и была представлена преимущественно элементами лимфобластоидного типа. Эти элементы имели ядра овальной формы, содержащие 1—2 нуклеолы

и относительно широкую иногда вакуолизированную цитоплазму (рис. 2). В препаратах встречались единичные клетки с нежным рыхлым ядром и тени Гумпрехта. Некоторые клетки имели многочисленные отростки, отходящие венчиком (рис. 3). Часто определялись элементы в разных фазах митоза. При электронно-микроскопическом исследовании культуры ЧСЛ-1 в 0,5–3% клеток обнаруживались вирусы, имеющие морфологические признаки вирусов группы герпеса (5). Эти вирусные частицы определялись в ядре, перинуклеарном пространстве, цитоплазматических вакуолях и вне клеток. Зрелые вирусные частицы диаметром 115–120 нм были окружены двойной мембраной и содержали электроноплотный материал (рис. 4).

Для проверки туморогенной способности вируса, ассоциированного с клетками культуры ЧСЛ-1, последние вводили сирийским хомякам обоего пола под слизистую оболочку защечного мешка и внутримышечно в количестве $4,5 \cdot 10^6$ и $8 \cdot 10^6$ клеток соответственно. Наблюдение в течение 3 мес. не выявило патологии у этих животных. Для проверки инфекционных свойств выделенного вируса 1–2-дневных сосунков белых мышей заражали инъекцией в мозг экстракта, приготовленного из 10^8 клеток путем их 3-кратного замораживания и оттаивания. Зараженные животные в течение 1 мес. наблюдения оставались клинически здоровыми. Эти опыты свидетельствуют о том, что исследуемый вирус не обладает туморогенными и инфекционными свойствами и не является вирусом Hsimplex.

Иммунофлуоресцентное исследование культуры ЧСЛ-1, проведенное по методу Хенль и соавторов (6), с использованием типизирующей сыворотки больного карциномой носоглотки, обнаружило 1,8–3,2% клеток с яркой гранулярной цитоплазматической флуоресценцией. Характер этой реакции был сходен с флуоресценцией цитоплазмы клеток культуры В 95–8, представляющей трансформированные вирусом Эпштейн — Барр лимфоциты икры. Типизирующая сыворотка больного раком постназального пространства в разведении 1:640 выявляла цитоплазматический антиген в клетках культуры ЧСЛ-1 и В 95–8. Сыворотка больного Ч., из опухолевого материала которого получена суспензионная культура ЧСЛ-1, также содержала антитела в титре 1:320, выявляющие вирусный капсидный антиген в клетках культур ЧСЛ-1 и В 95–8.

Вирус, изолированный из клеток и культуральной жидкости культуры ЧСЛ-1, обнаруживается в градиенте плотности сахарозы в виде двух четких пиков с плотностями 1,21 и 1,24 г/см³. В этих же зонах локализуется связанная с ³H-тимидином радиоактивность. Как показало электронно-микроскопическое исследование, в первом пике обнаруживаются покры-

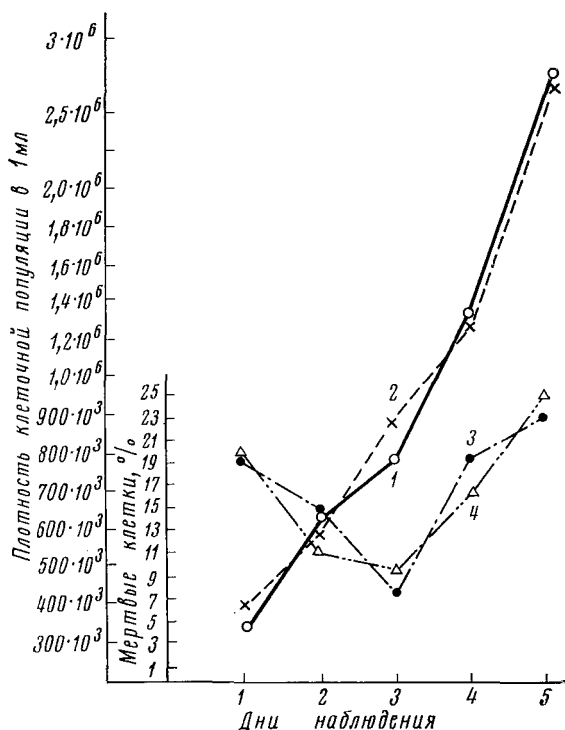


Рис. 1. Проплиферация клеток культуры ЧСЛ-1. 1 — размножение клеток в атмосфере 5% CO₂, 2 — размножение клеток во встряхивающем аппарате, 3 — мертвые клетки в атмосфере 5% CO₂, 4 — мертвые клетки во встряхивающем аппарате

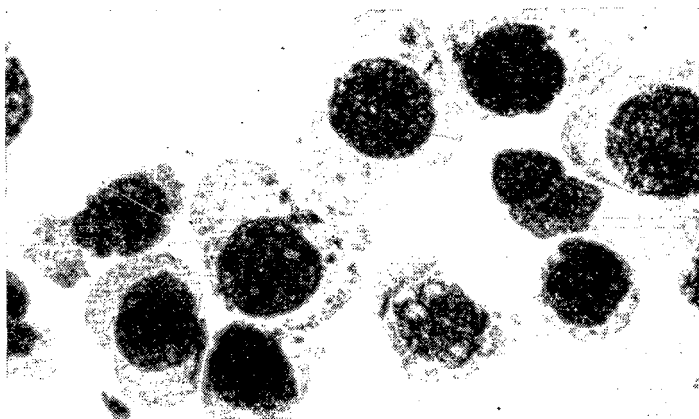


Рис. 2. Общий вид клеток культуры ЧСЛ-1. Окраска по Романовскому — Гимза, 500X

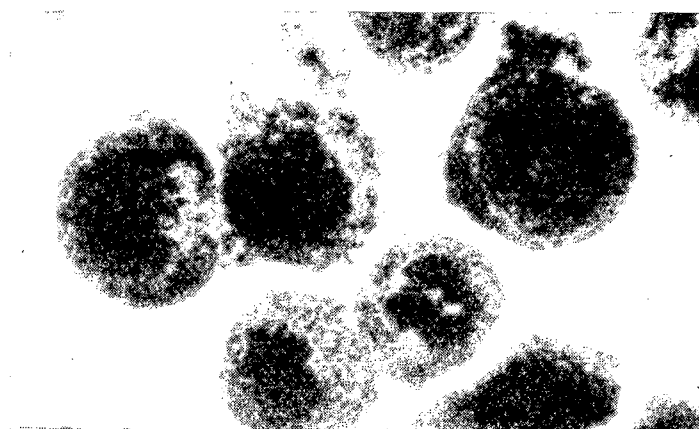


Рис. 3. Делящиеся и отростчатые клетки культуры ЧСЛ-1. Окраска по Романовскому — Гимза, 900X

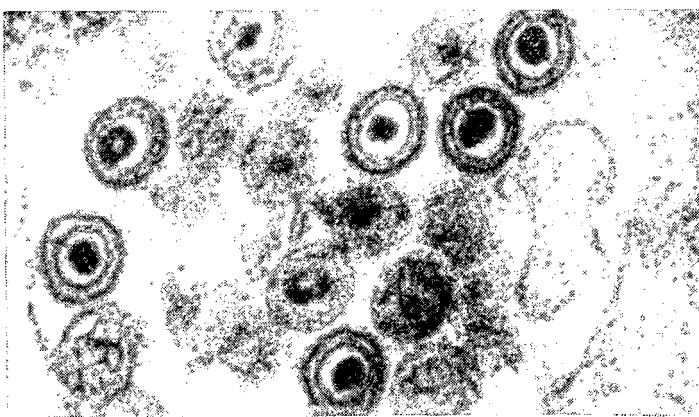


Рис. 4. Скопление зрелых вирусных частиц в околоядерном пространстве, 120 000X

Таблица 1

Радиоиммунопреципитация меченного по ^3H -тимидину вируса

Источник сыворотки	Разведе- ние сы- воротки	Радиоак- тивность в надо- садке *, %	Источник сыворотки	Разведе- ние сы- воротки	Радиоак- тивность в надо- садке *, %
Лимфома Беркитта	1:40	29	Здоровый человек	1:10	94
Карцинома посо- глотки	1:10	27	Павиан гамадрил	1:40	38

* Каждая цифра — среднее из трех определений.

тые оболочкой вирионы и пустые нуклеокапсиды, во втором — нуклеокапсиды. Анализ выявленных структур в градиенте плотности хлористого цезия показал плотность $1,27 \text{ г/см}^3$ для цельных вирионов и $1,30 \text{ г/см}^3$ для нуклеокапсидов. Константа седиментации вирусной ДНК, определенная по Мартину, Эймсу (⁷) с применением в качестве маркера ДНК фага Т2, составляет $54 \pm 3S$. Плавающая плотность вирусной ДНК в градиенте хлористого цезия равна $1,716 \text{ г/см}^3$.

Для уточнения иммунологического родства ЭБВ и изучаемого вируса была поставлена реакция радиоиммунопреципитации с использованием меченного по ^3H -тимидину вируса. Оказалось, что сыворотка людей, больных лимфомой Беркитта и назофарингеальной карциномой, а также сыворотка павиана гамадрила с высоким титром антител к ЭБВ, определяемым в реакции иммунофлуоресценции (⁸), осаждают около 70% радиоактивного материала (табл. 1).

На основании представленных данных можно заключить, что в клетках культуры ЧСЛ-1 содержится вирус близкий или аналогичный вирусу Эпштейн — Барр. Имеющиеся в литературе работы связывали лимфогранулематоз с вирусом Эпштейн — Барр только на основании определения антител к этому вирусу (⁹⁻¹²). Наше сообщение представляет интерес, поскольку не только косвенно свидетельствует о связи вируса типа Эпштейн — Барр с лимфогранулематозом путем обнаружения антител, но и прямо демонстрирует присутствие вируса в клетках культуры, полученной от этого больного.

Институт экспериментальной патологии и
терапии
Академии медицинских наук СССР
Сухуми

Поступило
14 X 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. A. Epstein, Y. M. Barr, Lancet, v. 1, 252 (1964). ² G. Henle, W. Henle, V. Diehl, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 59, 94 (1968). ³ M. Nonoyama, J. S. Pogano, Nature, v. 242, 44 (1973). ⁴ W. Henle, G. Henle, In: Comparative Leukemia Res., 1970, p. 706. ⁵ M. A. Epstein, G. Henle et al., J. Exp. Med., v. 121, 761 (1965). ⁶ G. Henle, W. Henle, J. Bacteriol., v. 91, 1248 (1966). ⁷ R. G. Martin, B. N. Ames, J. Biol. Chem. v. 236, 1372 (1961). ⁸ Б. А. Ланин, В. З. Азрба и др., ДАН, т. 222, 244 (1975). ⁹ J. M. Goldman, A. C. Aisenberg, Cancer, v. 26, 327 (1970). ¹⁰ B. Johansson, G. Klein et al., Intern. J. Cancer, v. 6, 450 (1970). ¹¹ P. H. Lewine, D. V. Ablashi et al., Cancer, v. 27, 416 (1971). ¹² P. H. Levine, In: Intern. Agency for Res. on Cancer World Health Organization, Lyon, France, 1972, p. 384.