

Ю. Т. АЛЕКСАНИЯ

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДЛИТЕЛЬНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

В работе рассматриваются возможности использования маркированных по антигенам культивируемых опухолевых клеток для разработки некоторых вопросов иммуногенетики соматических клеток и экспериментальной онкологии. Приводятся результаты изучения антигенного состава длительно выращиваемых вне организма опухолевых клеток человека и животных.

Для изучения биологии раковой клетки значительные возможности открыл метод однослойных клеточных культур [23, 24]. Использование этого метода сделало возможным проведение широких исследований по выяснению механизмов канцерогенеза на клеточном уровне, взаимоотношений между карнотипом клеток и злокачественностью, свойств опухолевых клеток и т. д. Однослойные культуры клеток опухолевого происхождения нашли широкое применение при изучении вирусной этиологии происхождения опухолей [13, 21]. Роль однослойных клеточных культур в разрешении вопросов генетики соматических клеток [20, 28, 31, 38] трудно переоценить, а эти исследования имеют большое значение для понимания механизмов трансформации нормальной клетки в опухолевую.

Значительный интерес представляют исследования по выяснению процесса появления перевиваемых клеточных линий. Важнейшая и характерная особенность перевиваемых клеток — высокая пролиферативная активность и потенция неограниченного размножения. Механизмы появления перевиваемых клеток пока не вскрыты. В этом аспекте важно внести определенность в вопрос о соотношении процессов злокачественности и появления перевиваемых клеточных линий.

Метод однослойных клеточных культур создал большие возможности и для исследования иммунобиологических свойств опухолевых клеток. Изучение антигенной структуры культивируемых опухолевых клеток важно не только для полноты суждения об иммунобиологических свойствах этих клеток, но и для маркирования их по антигенам. В этом аспекте следует отметить большое значение антигенов как маркеров в иммуногенетике [1, 14, 29, 44]. В докладе ВОЗ по иммунологии [16] отмечается, что «тканевые антигены могут иметь... широкое применение в таких областях, как биология клеток, культуры тканей (трансформация), генетические маркеры, дифференциация, онтогенез и др.». Антигены рассматриваются в качестве естественных маркеров культивируемых соматических клеток [3, 25, 40, 50] и используются для иденти-

фикации процесса слияния клеток при межвидовой и внутривидовой гибридизации культивируемых соматических клеток [17, 59]. Гибридизация клеток в культуре в настоящее время начинает использоваться не только в области иммуногенетики соматических клеток, но и экспериментальной онкологии—для усиления противоопухолевой резистентности, путем инокуляции реципиентам межвидовых гибридов культивируемых клеток [17]. Однако вопрос об антигенной структуре культивируемых клеток изучен недостаточно и нуждается в дальнейшей разработке. Дальнейшее изучение антигенных свойств опухолевых клеток в культуре дает возможность обнаружить стабильные антигены, которые можно использовать в качестве маркеров длительно выращиваемых вне организма клеток. Рассматривая вопрос об иммунобиологическом изучении опухолевых клеток в условиях культивирования их вне организма, следует отметить необходимость выяснения динамики возможных изменений всего комплекса антигенов. Такой подход может обеспечить всестороннюю иммунологическую характеристику длительно культивируемых клеток.

Культура клеток *in vitro* дает возможность изучить изменчивость опухолевых клеток, что имеет огромное теоретическое и практическое значение. Изменчивость биологических свойств длительно культивируемых опухолевых клеток (утрата или ослабление злокачественности) создает предпосылки для изучения возможности использования этих клеток в целях экспериментальной противоопухолевой вакцинации [37, 39]. Это свидетельствует о важности изучения иммунобиологических свойств культивируемых опухолевых клеток также для познания иммунобиологических аспектов взаимоотношений опухоли и организма.

В настоящее время имеется значительное количество работ, посвященных получению из опухолевых тканей перевиваемых клеточных линий, характеризующихся потенцией высокой и неограниченной пролиферации [5, 11, 26, 43, 47, 56]. Эксплантированные клетки, прежде чем приобрести способность к бесконечно длительной пролиферации, должны культивироваться в течение более или менее длительного периода времени, обычно исчисляемого рядом месяцев. Еще неясно, почему для приобретения культивируемыми клетками способности к неограниченной пролиферативной активности необходим довольно длительный промежуток времени. Представляет интерес то обстоятельство, что длительный период времени необходим при получении линии перевиваемых клеток не только из нормальных, но и из опухолевых тканей. Малигнизированные клетки, подобно клеткам нормального происхождения, претерпевают при длительном выращивании вне организма биологическую трансформацию, выражающуюся в появлении перевиваемых клеток. До настоящего времени недостаточно решен вопрос о наличии критерия, который позволял бы определить период, с которого клеточную культуру можно рассматривать как перевиваемую. В литературе имеется предложение считать перевиваемой линией клетки, культивируе-

мые *in vitro* в течение 12 и более месяцев и не обнаруживающие признаков снижения скорости размножения [60]. Нам представляется целесообразным для идентификации процесса появления перевиваемых клеток использовать комплекс относительных критериев: 1) продолжительность культивирования клеток (свыше 12 месяцев); 2) резкое повышение пролиферативной активности и митотического индекса культивируемых клеток; 3) резкое ускорение синтеза ДНК и РНК; 4) изменения в антигенном составе поверхности клеток; 5) анеуплоидия культивируемых клеток; 6) образование фокусов или очагов трансформации с изменением типа роста клеток. При получении клеточной линии наблюдается изменение типов роста клеток, однако характерным признаком установившейся линии перевиваемых клеток является стабилизация типа клеточного роста (эпителиоподобного или фибробластоподобного).

Рядом исследователей [5, 18, 52, 57] отмечено сохранение злокачественности длительно культивируемых клеток опухолевого происхождения. Однако в литературе имеются также данные, свидетельствующие об утрате или ослаблении их злокачественности [26, 33, 46, 47, 49]. Для выяснения механизма утраты злокачественности культивируемых опухолевых клеток необходимы дальнейшие исследования.

Некоторые исследователи [41, 54] отождествляют процесс малигнизации с биологической трансформацией клеток в культуре, выражающейся в появлении перевиваемых клеток. Однако, если злокачественность и приобретение культивируемыми клетками способности к неограниченной пролиферации являются тождественными процессами, то неясно, почему перевиваемая клеточная линия появляется далеко не из каждого опухолевого эксплантата. Неясно также, почему при получении клеточных линий из опухолевых тканей так же, как и при выведении клеточных линий из нормальных тканей, необходим длительный период времени. Ведь, казалось бы, культивируются опухолевые клетки и этого уже должно было быть достаточно для того, чтобы культивируемые клетки уже с первых пассажей обладали высокой пролиферативной активностью, присущей установившимся клеточным линиям. Следует отметить также весьма существенное обстоятельство, заключающееся в том, что длительно культивируемые клетки могут утратить злокачественность, сохраняя при этом высокую пролиферативную активность. Учитывая изложенные соображения, следует считать достаточно обоснованными представления, согласно которым злокачественность и появление перевиваемых клеток являются процессами, обусловленными разными причинами [4, 9, 10, 30, 34].

Получение перевиваемых клеточных линий дает возможность исследовать антигенную структуру длительно культивируемых клеток опухолевого происхождения с целью выяснения их иммунобиологических свойств и выявления стабильных антигенных маркеров.

Рядом работ [27, 42, 45] выявлено сохранение клеточных видоспецифических антигенов длительно культивируемых клеток человеческого

и животного происхождения. Нами с помощью цитотоксического теста и реакции агглютинации клеток было показано сохранение клеточных антигенов видовой специфичности клеток линии МГХХIIa, полученной из солидной формы перевиваемой мышинной гепатомы ХХIIa [6]. Клеточные видоспецифические антигены можно использовать в качестве маркеров для идентификации видовой принадлежности длительно выращиваемых вне организма клеток.

Имеющиеся в литературе данные о наличии изоантигенов системы АВО в культивируемых опухолевых клетках человеческого происхождения довольно противоречивы [36, 51, 55]. Не исключено, что в некоторых случаях антигены системы АВО не были обнаружены в длительно культивируемых клетках по причинам методического порядка. Изоантигены системы АВО были обнаружены с помощью комплекса иммунологических методов (реакции специфической абсорбции изогемагглютинирующих сывороток, реакции дробного истощения стандартных сывороток, реакции смешанной агглютинации) в длительно культивируемых клетках опухолевого и нормального происхождения (клетках линий Hela, Liver, Cave, 580, A-1), предварительно разрушенных многократным замораживанием и оттаиванием [22]. Иммунологический анализ изоантигенов в субклеточных фракциях (митохондрии, микросомы, клеточный сок) подтвердил ранее сделанное предположение [22] о топографически более глубокой локализации изоантигенов АВО в клетках перевиваемых линий [15]. Полученные данные свидетельствуют о наличии изоантигенов системы АВО в субклеточных фракциях, выделенных из длительно выращиваемых *in vitro* клеток человека (линий Hela, Cave, A-1, 580, Tg—33). Из изложенного следует, что в процессе длительной эксплантации клеток сохраняется синтез антигенов АВО, однако они обнаруживаются в глубинных структурах клеток, на клеточной поверхности их не удастся выявить. В нормальных клетках мышей линии СЗНА были обнаружены изоантигены, сохраняющиеся в тканях гепатомы ХХIIa и клетках линии МГХХIIa [8]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что процессы малигнизации и длительной эксплантации клеток существенно не затрагивают изоантигенную дифференцировку тканей и культивируемых клеток. Следовательно, изоантигены так же, как и клеточные видоспецифические антигены, могут быть использованы в качестве маркеров длительно выращиваемых вне организма клеток.

С точки зрения антигенного маркирования культивируемых клеток представляет интерес изучение также гетерогенных антигенов. В длительно культивируемых клетках крысиной карциномы РА (в клетках линии РПК) с помощью метода специфической абсорбции антител и метода последовательного (дробного) истощения нормальных групповых сывороток изучалось наличие антигена, сходного с В-изоантигеном человека [22]. В клетках линии РПК, разрушенных многократным замораживанием и оттаиванием, был выявлен гетерогенный В-антиген, сходный с В-изоантигеном человека. Обнаружение этого антигена в

субклеточных фракциях клеток линии РПК [15] свидетельствует о наличии его в глубоких структурах длительно культивируемых крысиных опухолевых клеток. Стойкое сохранение гетерогенного В-антигена в культивируемых клетках позволяет использовать его в качестве маркера малигнизированных и длительно эксплантируемых клеток.

В литературе имеются единичные сведения по выявлению органоспецифических белков культивируемых вне организма опухолевых клеток [19, 53]. Нами с помощью метода иммуноауторадиографии была установлена способность длительно (3 года) культивируемых клеток линии МГХХIIa синтезировать сывороточные белки альбумин и трансферрин [7], что свидетельствует о сохранении органоспецифических свойств длительно культивируемых клеток мышинной гепатомы ХХIIa.

Ряд исследователей [12, 32, 35, 48] приводит данные о сохранении опухолеспецифических антигенов в длительно выращиваемых вне организма опухолевых клетках. Однако вопрос о природе этих антигенов выяснен недостаточно. В этом аспекте большой интерес представляют исследования, посвященные синтезу эмбрионального альфа-глобулина культивируемыми опухолевыми клетками [2, 47, 58]. Нами была изучена возможность синтеза альфа-фетопротейна клетками линии МГХХIIa [7]. С помощью метода иммуноауторадиографии было показано, что клетки линии МГХХIIa, несмотря на длительное (3 года) культивирование вне организма, сохраняют способность синтезировать альфа-фетопротейн. Сохранение клетками линии МГХХIIa способности синтезировать альфа-фетопротейн открывает возможности для применения этого белка в качестве маркера при изучении дифференцировочных процессов в малигнизированных и эксплантируемых клетках. Клоновая культура клеток гепатомы ХХIIa продуцировала альбумин, трансферрин и альфа-фетопротейн, что дает основание для заключения об отсутствии на клеточном уровне «антагонизма» в синтезе белков сыворотки взрослых животных и эмбриоспецифического белка.

Таким образом, клеточные видоспецифические антигены, изоантигены, в частности антигены системы АВО, гетерогенный В-антиген можно рекомендовать для использования в качестве стойких маркеров длительно культивируемых опухолевых клеток при разработке различных вопросов иммуногенетики соматических клеток и экспериментальной онкологии.

Институт экспериментальной биологии

АН АрмССР

Поступило 15.XII 1975 г.

Յու. Թ. ԱԼԵՔՍԱՆՅԱՆ

ԵՐԿԱՐԱՏԵՎ ԿՈՒԼՏԻՎԱՑՎՈՂ ՈՒՌՈՒՑՔԱՅԻՆ ԲՁԻՁՆԵՐԻ
ԻՄՈՒՆՈՔԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա. մ. փ. ո. փ. ո. լ. մ.

Դիտվել է ուսուցչային բժշկների կուլտուրայի կիրառման հնարավորությունները սոմատիկ բժշկների իմունոգենետիկայի և փորձառական օնկոլոգիայի տարրեր հարցերի մշակման նպատակով:

Չարորակությունը և փոխադաստիճանը բջիջների գծի ի հայտ գալը պրոցեսներ են, որոնք պայմանավորված են տարրեր պատճառներով:

Բջջային տեսակասպեցիֆիկ անտիգենները, իզոանտիգենները, և մասնավորապես ABO սիստեմի անտիգենները, հետերոգեն B-անտիգենը կայուն պահպանվում են երկարատև կուլտիվացվող ուռուցքային բջիջներում:

Մկնային XIIa հեպատոմայի բջիջները, շնայած երկարատև (3 տարի) կուլտիվացմանը, պահպանում են էմբրիոսպեցիֆիկ ալֆա-գլոբուլինի, շիճուկային սպիրտակուցների՝ ալբումինի և տրանսֆերինի սինթեզի ունակությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Абелев Г. И. Сб. Биология злокачественного роста, 180, М., 1965.
2. Абелев Г. И. Вестн. АМН СССР, 7, 49, 1970.
3. Алексанян Ю. Т. Биологический журнал Армении, 21, 11, 92, 1968.
4. Алексанян Ю. Т. Биологический журнал Армении, 28, 1, 116, 1975.
5. Алексанян Ю. Т., Басмаджян М. Е., Мовсесян К. С., Манукян Л. А., Геворкян С. К. Бюлл. exper. биол. и мед., 5, 94, 1972.
6. Алексанян Ю. Т., Мовсесян К. С., Аракелян Л. А. Биологический журнал Армении, 26, 10, 88, 1973.
7. Басмаджян М. Е., Алексанян Ю. Т. Бюлл. exper. биол. и мед., 10, 84, 1974.
8. Басмаджян М. Е., Алексанян Ю. Т., Месропян Н. П., Балабаджян Н. Г. Журн. exper. и клин. мед., 5, 67, 1973.
9. Гаврилов В. И. Перевиваемые клетки в вирусологии. М., 1964.
10. Добрынин Я. В. Вопр. онкологии, 4, 98, 1973.
11. Добрынин Я. В., Дирлугян Р. П. Вопр. онкологии, 7, 1, 74, 1961.
12. Ерошкина А. М., Колмыкова В. Н. Вопр. онкологии, 7, 1, 60, 1961.
13. Жданов В. М., Лапин Б. А., Соловьев В. Д., Мазуренко Н. П., Бектемиров Т. А., Ильин К. В., Быковский А. Ф. Сб. Молекулярная биология вирусов, 145, М., 1972.
14. Жуков-Вережников Н. Н., Трибулев Г. П. Руководство по микробиологии, эпидемиологии и клинике инфекционных болезней, 3, 15, М., 1964.
15. Зыков Ю. В., Тимофеев В. Т., Трибулев Г. П., Алексанян Ю. Т. Бюлл. exper. биол. и мед., 5, 43, 1969.
16. Исследования по иммунологии. ВОЗ, Женева, 1965.
17. Ключарева Т. Е., Матвеева В. А., Дейчман Г. И. Бюлл. exper. биол. и мед., 11, 72, 1972.
18. Левина Д. М., Парнес В. А., Исаева О. П., Варшавский А. Г., Гаврилов В. И., Плешивцева В. В., Блюмкин В. Н. Вопр. онкологии, 9, 111, 1969.
19. Перова С. Д. Автореф. канд. дисс., М., 1969.
20. Погосянц Е. Е., Захаров А. Ф. Сб. Биология злокачественного роста, 152, М., 1965.
21. Соловьев В. Д., Баландин И. Г. Клетка и вирус. М., 1973.
22. Тимофеев В. Т., Трибулев Г. П., Подоплелов И. И., Алексанян Ю. Т. Бюлл. exper. биол. и мед., 7, 80, 1967.
23. Тимофеевский А. Д. Сб. Культура тканей в онкологии, 15, М., 1968.
24. Тимофеевский А. Д. Сб. Тр. 7-й итоговой научн. конф. Ин-та экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР, 281, М., 1971.
25. Трибулев Г. П., Подоплелов И. И. Сб., мат-лы докл. конф. по экспериментальной медицинской генетике, 38, М., 1964.
26. Трибулев Г. П., Подоплелов И. И., Алексанян Ю. Т., Глинский И. А., Тимофеев В. Т. Бюлл. exper. биол. и мед., 1, 90, 1968.
27. Трибулев Г. П., Подоплелов И. И., Алексанян Ю. Т., Глинский И. А., Тимофеев В. Т., Шарый Н. И. Сб. Культура тканей в онкологии, 305, М., 1968.

28. Шапиро Н. И. Сб. Актуальные вопросы современной генетики, 266, М., 1966.
29. Эфроимсон В. П. Иммуногенетика, М., 1971.
30. Barski G., Cassingena R. J. Nat. Cancer Inst., 30, 5, 865, 1963.
31. Barski G., Sorieul S., Cornefert Fr. C. R. Acad. Sci., 251, 17, 1825, 1960.
32. Bubenik I., Baresova M., Vlklicky V., Jakoubkova J., Sainerova H., Donner I. Int. J. Cancer, 11, 3, 765, 1973.
33. Castelli L., Marcante M., Caputo A. Z. Krebsforsch. und Klinische onkol., 79, 4, 224, 1973.
34. De Somer P., Prinzie A. In: Biological Approaches to Cancer Chemotherapy, Academic Press, London—N. Y., 245, 1961.
35. Dickinson J. P., Caspary E. A., Field E. J. Nature, 239, 93, 181, 1972.
36. Ebina T., Homma M., Ishida N., Kudo T. Tohoku J. Exp. Med., 104, 1, 93, 1971.
37. Eng C. P., Morgan J. F. Can. J. Microbiol., 18, 6, 775, 1972.
38. Ephrussi B., Weiss M. Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A., 53, 5, 1010, 1965.
39. Evans J. S., Mengel G. D. Cancer Res., 25, 1, 29, 1965.
40. Franks D. Biol. Revs. Cambridge Philos. Soc., 43, 1, 17, 1968.
41. Franks L. M., Cooper T. W. Int. J. Cancer, 9, 1, 19, 1972.
42. Furminger I. J. Pathol. and Bacteriol., 89, 1, 337, 1965.
43. Gey G., Coffman W., Kubicek M. Cancer Res., 12, 4, 264, 1952.
44. Hirschhorn K. Bull. of the New York academy of medicine, 4, 5, 343, 1964.
45. Holmgren B. N., Payne F. E. J. Nat. Cancer Inst., 35, 3, 355, 1966.
46. Hsu T., Klatt O. J. Nat. Cancer Inst., 22, 2, 313, 1959.
47. Irlin I. S., Perova S. D., Abelev G. I. Int. J. Cancer, 1, 337, 1966.
48. Jami J., Ritz E. Cancer Res., 33, 10, 2524, 1973.
49. Katsuta H. Acta pathol. Japan, 13, 4, 235, 1963.
50. Korngold Rh. Reprinted from the University of Michigan Medical Bull., Ann Arbor, 28, 337, 1962.
51. Majsky A., Rerabkova E., Peskova D. Neoplasma, 9, 2, 141, 1962.
52. Makino S., Sasaki K., Muchara N., Nakamura N., Kasahara Sh. Kitasato Arch. Exptl. Med., 41, 3-4, 113, 1968.
53. Mc Allister R., Melnyk J., Finklestein J., Adams E., Gardner M. Cancer, 24, 3, 520, 1969.
54. Moore A., Southam C., Sternberg H. Science, 124, 32, 127, 1956.
55. Moor-Jankowski J. J. Genet. Hum., 12, 88, 1963.
56. Nagura H. Tohoku J. Exp. Med., 106, 2, 147, 1972.
57. Plata E., Aoki T., Robertson D., Chu E., Gerwin B. J. Nat. Cancer Inst., 50, 4, 849, 1973.
58. Quelin S., Rioche M., Bresson Y., Masseyeff R. C. R. Acad. Sci., D 274, 5, 768, 1972.
59. Spencer R., Hauschka T., Amos D., Ephrussi B. J. Nat. Cancer Inst., 33, 5, 893, 1964.
60. Syverton J., Mc Laren L. Cancer Res., 17, 9, 923, 1957.