

Н. У. НАДЖАРЯН

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ
КЛЕТОК ЭМБРИОНА СЕРОГО (АРМЯНСКОГО) ХОМЯЧКА

Из первичной культуры эмбриональных клеток серого хомячка получена новая перевиваемая клеточная линия НХЭТ, прошедшая 135 пассажей в течение двух лет культивирования.

Дана цитоморфологическая и культуральная характеристика клеточной линии, изучены ее онкогенные потенции. Для клеток стабильной линии НХЭТ характерен достаточно высокий уровень митотической активности, интенсивное выделение кислых продуктов обмена, быстрый темп роста.

Перевиваемая линия клеток НХЭТ представляет интерес в аспекте изучения ее чувствительности к некоторым онкогенным и инфекционным вирусам.

Получение новых линий перевиваемых клеток представляет значительный интерес для вирусологических исследований, т. к. перевиваемые линии широко используются для культивирования различных вирусов, изучения механизмов злокачественной трансформации клеток и ряда других вопросов. Следует отметить, что стабильные клеточные линии эмбрионального происхождения отличаются более широким спектром чувствительности к вирусам, чем первичные культуры гомологических клеток взрослых животных [1, 9].

Известно, что первичные культуры армянских хомячков высоко чувствительны к различным онкогенным вирусам—полиоме, SV—40, человеческим аденовирусам [7, 8], вирусу Рауса [3, 5] и потому представляли собой удобную модель для изучения взаимодействия вируса и клетки.

Задачей настоящей работы являлось получение линии перевиваемых клеток эмбриона армянского хомячка и характеристика ее биологических свойств.

Материалы и методы

Исходным материалом для получения линии перевиваемых клеток служили эмбрионы армянских хомячков, взятые в конце последней недели беременности. После удаления внутренностей, головы и конечностей измельченные тушки эмбрионов триспинизировали по методике, предложенной Бодианом [6]. Клеточную взвесь в концентрации $5 \cdot 10^5$ в 1 мл засеивали в матрасы Павитской различной емкости и во флаконы Карреля. В качестве ростовой среды использовали среду 199 (2 части), 0,5% гидролизата лактальбумина (1 часть) и 20% инактивированной

бычей сыворотки. Культуры пассировали после формирования монослоя без использования версена механическим способом.

При первых пассажах пересевы производили из расчета 1:2 или 1:3 флакона (200 000 клеток в 1 мл), в дальнейшем, после формирования перевиваемой линии, пересевы культуры осуществляли суспензией, содержащей 80 000 клеток в 1 мл. Цитологическое изучение проводили на живых культурах и окрашенных препаратах. Митотическую активность выражали в промилле [2]. Время генерации и продолжительность митоза определяли по О. И. Епифановой с соавторами [4]. Изучали рост культивируемых клеток, определяя их коэффициент пролиферации; динамику размножения клеток определяли ежедневным подсчитыванием в течение 7 дней количества живых клеток в отдельных пробирках, в которые одновременно засевали по 150 000 клеток. Пробу на онкогенность производили введением живых клеток культуры гомологичным животным.

Результаты опытов

Всего было поставлено 12 первичных культур, из которых лишь одна в дальнейшем сформировалась в перевиваемую линию, названную нами НХЭТ. Необходимо отметить, что клетки всех первичных однослойных культур после периода интенсивного роста, продолжавшегося около 5—6 пассажей (1—1,5 месяца с момента эксплантации), вступали в период замедленной пролиферации, когда формирование монослоя имело место спустя 2—2,5 недели. В этих условиях пересевы клеток не производились и культуры поддерживались лишь частичной сменой питательной среды через каждые 3—4 дня. Спустя 2 месяца клеточный пласт во всех матрасах почти полностью дегенерировал. В дальнейшем, на 3-ем месяце культивирования, в одном из матрасов было обнаружено несколько мелких фокусов роста, выросших спустя 15 дней в большие колонии размером до 0,2—0,6 см (рис. 1). В центре колонии клеточные элементы располагались в несколько слоев, а по периферии фибробластоподобные клетки образовывали сеть, в петлях которой располагались мелкие округлые клетки. Описываемые клеточные колонии дали начало перевиваемой линии клеток, которая прошла 135 пассажей в течение 2 лет при регулярных пересевах с интервалом в 4—5 дней.

Таким образом, из 12 поставленных культур только одна сформировалась в перевиваемую линию—НХЭТ.

Для полученной нами клеточной линии НХЭТ характерен фибробластоподобный тип роста; в клеточном пласте преобладают в основном отросчатые клетки, напоминающие фибробласты; одновременно встречается небольшое количество круглых, полигональных клеток. Отмечается вариабельность размеров клеток и ядер, форма ядер в большинстве случаев круглая или овальная, количество ядрышек колеблется от 1 до 4 (рис. 2а). Иногда встречаются многоядерные клетки и клетки с гигантскими уродливыми ядрами, что придает культуре в известной

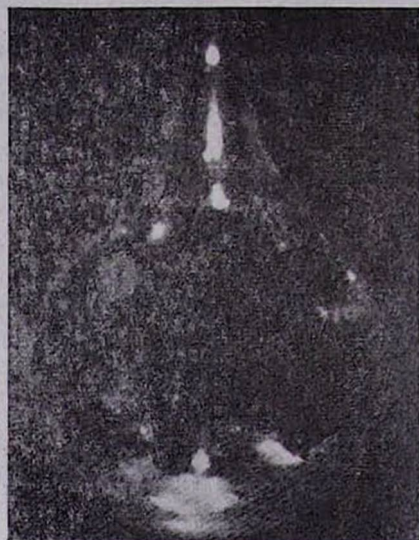


Рис. 1. Фокусы роста эмбриональных клеток хомячка, 3-й месяц культивирования вне организма. Натуральная величина.

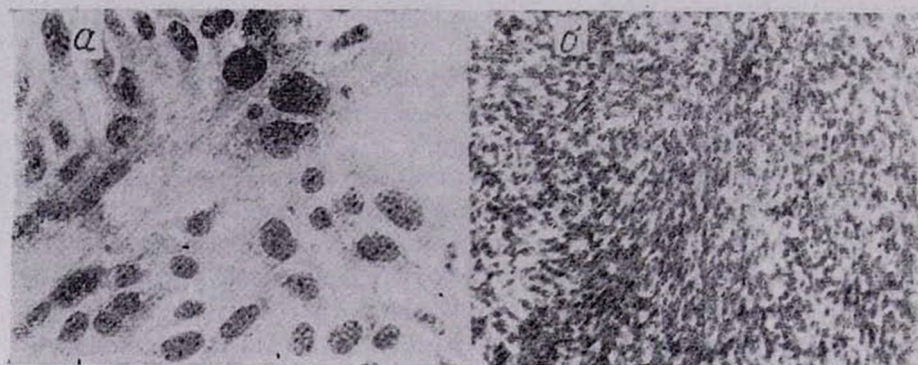


Рис. 2. а. Культура клеток НХЭТ, полиморфизм клеток и ядер. Фигура атипического митоза. Гематоксилин-эозин. Ув. в 500 раз.

б. Веретеноклеточная саркома хомячка, возникшая после трансплантации клеток культуры НХЭТ 105-го пассажа. Гематоксилин-эозин. Ув. в 150 раз.

степени полиморфный характер. Среди делящихся клеток обнаруживается значительное число патологических митозов, в частности, отмечаются различные варианты атипических метафаз (многополюсные и многогрупповые метафазы, отставание хромосом и т. д.).

Митотическая активность культуры на 48-часовом сроке культивирования составляет 25—28%. Длительность протекания митоза в стабильной линии НХЭТ равна 51 мин, а продолжительность митотического цикла (т. е. время генерации)—34,5 часа.

Характерной особенностью пересаживаемой клеточной линии НХЭТ является высокий уровень метаболической активности (быстрый сдвиг

РН). Культивируемые клетки имеют довольно высокий темп роста (коэффициент пролиферации—4,5), обладают небольшой адгезивной способностью.

Динамика размножения клеток характеризуется активным ростом клеток, количество которых к 5—6-му дню культивирования соответственно возрастает в 2, 3, 4 раза, после чего клетки начинают сползать со стекла. При посеве 80 000 клеток в 1 мл питательной среды монослой формируется к 4—5-му дню.

В процессе культивирования клеток перевиваемой линии проводилось систематическое исследование их онкогенной активности. До 95-го пассажа при подкожном введении живых клеток взрослым и двухнедельным хомячкам в количестве $5 \cdot 10^6$ клеток опухоли не развивались. Примерно с 98—100-го пассажа культура приобрела злокачественные свойства и инокуляция такой же дозы живых клеток гомологичным животным приводила к образованию опухолей, представляющих собой веретеноклеточные саркомы (рис. 2б).

Обсуждение

Итак, перевиваемая клеточная линия НХЭТ претерпела длительный процесс становления, обычно наблюдаемый при получении клеточных штаммов из нормальных тканей [1]. Изучение цитоморфологических особенностей стабильной линии НХЭТ выявило ряд общих черт, характерных для большинства клеточных линий: полиморфизм клеток и ядер, большой процент патологических митозов, наличие в культуре гигантских многоядерных клеток. Однако наряду с этим клетки НХЭТ отличаются достаточно высоким уровнем митотической активности, невысокой адгезивной способностью, интенсивным выделением кислых продуктов обмена и активным ростом клеток.

Таким образом, все вышеизложенное, а также то обстоятельство, что клеточная культура НХЭТ прошла 135 пассажей в течение двух лет культивирования, не снижая темпов роста, свидетельствует о том, что нами получена новая стабильная линия перевиваемых клеток, успешно используемая для изучения чувствительности ее к ряду онкогенных и инфекционных вирусов.

Вирусологическое отделение
Республиканской санэпидстанции
Минздрава АрмССР

Поступила 27/XII 1973 г.

Ե. Հ. ՆԱԶԱՐԵԱՆ

ԳՈՐԾ (ՀԱՅԿԱԿԱՆ) ՀԱՄԱՍՏԵՐԻԿԻ ԱՆԸՆԴՀԱՆ ՊԱՏՎԱՍՏՎՈՂ ԲԶՋԱՅԻՆ ԳԾԻ
ՍՏԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՆՐԱ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Ա. Բ. Փ. Ն. Փ. Ն. Փ.

Գործ Համաստերիկի սաղմնային բջիջների առաջնային կուլտուրայից ստացված է անընդհատ պատվաստվող բջջային գիծ (նեկՏ), որը 2 տարվա ընթացքում անցել է 135 պասսի:

Տրված է բջջային գծի ցիտոմորֆոլոգիական և կուլտուրալ բնութագիրը, ուսումնասիրված է նրա օնկոգեն ունակությունը, որը դրսևորվել է մեկ և կես տարի անց՝ կուլտուրայի 95-րդ պատժից հետո:

ՆևէՏ բջջագծի համար բնորոշ է բավականին բարձր միտոտիկ ակտիվությունը, ցածր ադհեզիվ ունակությունը և փոխանակության թթու արգասիքների ինտենսիվ արտադրությունը:

Հետաքրքրություն է ներկայացնում ստացված բջջագծի զգայնության ուսումնասիրությունը օնկոգեն և ինֆեկցիոն վիրուսների նկատմամբ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гаврилов В. И. Перевиваемые клетки в вирусологии. М., 1964.
2. Залкинд С. Я., Уткин И. А. Успехи современной биологии, 1958, 31, 2, стр. 231.
3. Зильфян В. Н., Фичиджян Б. С. Вопросы вирусологии, 1968, 4, стр. 518.
4. Епифанова О. И., Зосимовская А., Лымакина Л. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1963, 1, стр. 8.
5. Мартirosян Д. М., Наджарян Н. У. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1971, 5, стр. 95.
6. Bodian D. Virology, 1956, 2, стр. 575.
7. Jerganian G., Cho S., Ho T., Nell M. Sympos. on Mutational process in Somatic cells. Praha, 1965, 349.
8. Jerganian G., Nell Marilyn B. Pros. Nat. Acad. Sci., 1966. 55, 5, 1066.
9. Macpherson Y. Advances Cancer Res., 1970, 13, 169.