

РОСТСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ В КУЛЬТУРЕ СПОНТАННО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ ЛЕЙКОЗНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

А. Л. Калвялите, Л. Ю. Пабрежайте, М. Р. Валюс,
К. В. Константиновичюс

Введение. Известно, что функционирование эукариотической клетки, в том числе и пролиферация, контролируются специфическими регуляторными макромолекулами в результате их взаимодействия с определенными рецепторами — молекулами белковой природы, локализованными на поверхности клеток-мишеней. Модификация рецептора является ключевым моментом в передаче регуляторного сигнала внутрь клетки. В настоящее время установлен, выделен и охарактеризован ряд факторов роста (ФР), запускающих пролиферацию соответствующих типов клеток [1, 2]. К ним причисляют не только полипептиды, непосредственно взаимодействующие с рецепторами пролиферации, но и вещества, стимулирующие синтез самих рецепторов. Обычно культивируемые нормальные клетки пролиферируют в ответ на находящиеся в сыворотке экзогенные ФР. В отличие от нормальных, у многих неопластических клеток потребность в сыворотке снижена, так как они сами секретируют в среду ФР, связывающиеся с рецепторами продуцирующих их клеток, в результате чего происходит аутоstimуляция роста [3—5]. Многочисленные данные указывают на взаимосвязь онкогенов с нормальными ФР или же их рецепторами. Другая возможность аутоstimуляции трансформированных клеток — генерация пролиферативного сигнала посредством внутриклеточных онкопродуктов [6, 7]. Согласно современным представлениям, размножение лимфоцитов (эффекторных клеток иммунной системы) является результатом активации различными антигенами или лектинами синтеза и секреции ФР Т- и В-лимфоцитов и формирования рецепторов на клеточной поверхности отвечающих на них клеток [8—10].

В данной работе в бессывороточной среде исследовалась пролиферация лимфоцитов периферической крови крупного рогатого скота, больного хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), неопластическим В-лимфопротиперативным заболеванием. Обнаружена спонтанная пролиферация лейкозных лимфоцитов при культивировании *in vitro* без добавления экзогенных ФР и в отсутствие митогенной стимуляции. Полученные данные указывают на присутствие активности, стимулирующей пролиферацию, в среде, кондиционированной культивируемыми лейкозными лимфоцитами (КС). Полученные данные позволяют объяснить спонтанную пролиферацию лейкозных лимфоцитов аутоstimуляцией. Предварительные сообщения результатов этой работы были опубликованы ранее [11, 12].

Материалы и методы. Для исследований использовали лимфоциты 10 животных, больных ХЛЛ. Детальное изучение закономерностей пролиферации клеток в культуре проводили на лимфоцитах крови одного животного (число лимфоцитов в 1 мм³ периферической крови варьировало от 50000 до 100000). Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной (20 ед/мл) крови. Фракционирование проводили по методу [13] в смеси 5,7 % фикола и 60 % верографина (удельная масса 1,077). Количество жизнеспособных клеток, неокрашивающихся трипановым синим, составляло в среднем 95 %. Чтобы исключить возможность стимуляции лимфоцитов фиколом, в отдельных опытах лимфоциты получали из цельной крови после гемолиза в растворе трис-NH₄Cl [14] и удаления прилипающих к стеклу клеток. Следует отметить, что эти процедуры не приводили к исчезновению спонтанной пролиферации лимфоцитов. Затем клетки трижды промывали раствором Хенкса, в зависимости от цели опыта разводили до концентрации 0,5—4 млн/мл в культуральной среде Игла (СССР) с антибиотиками (100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина), глутамином (0,3 мкг/мл) и инкубировали в конусных пробирках в конечном объеме среды 2 мл. В некоторых опытах культуральную среду через 24 ч после начала куль-

тивирования заменяли свежей. Синтез ДНК после определенного времени оценивали по включению [³H]тимидина во фракцию, нерастворимую в 5 %-ной трихлоруксусной кислоте. [³H]тимидин (СССР, 74 кБк/мл среды) добавляли за 20 ч до окончания культивирования.

Для приготовления КС лейкозные лимфоциты выращивали 48 ч при концентрации клеток 4 млн/мл. Супернатанты, полученные после осаждения клеток центрифугированием при 3000 g в течение 15 мин, диализовали 2 сут против 100-кратного объема среды Игла и хранили при 4 °С до тестирования. Активность, стимулирующую пролиферацию, в КС оценивали по увеличению спонтанного синтеза ДНК в лейкозных лимфоцитах (4 млн в 2 мл) после культивирования в течение 2 сут.

Устойчивость активности, стимулирующей пролиферацию, к температуре исследовали при 30-минутном термостатировании КС в водяной бане. Устойчивость к трипсину определяли при двухчасовой инкубации (37 °С) с добавлением 100 мкг/мл трипсина («Sigma», США). Протеолиз останавливали ингибитором трипсина (100 мкг/мл) из соевых бобов («Sigma», США). Контрольную среду, как и КС, подвергали аналогичным воздействиям, после чего проводили диализ.

Тестирование всех вариантов осуществляли в трех повторах 3—10 опытов. Синтез ДНК оценивали как в абсолютных единицах (нмп/мин), так и в процентах относительно контроля.

Результаты и обсуждение. Установлено, что в культивируемых лимфоцитах периферической крови крупного рогатого скота, больного ХЛЛ, без добавления экзогенных ФР или митогенной стимуляции происходит спонтанное увеличение синтеза ДНК. Спонтанной пролиферативной активностью *in vitro* обладали лимфоциты всех исследуемых животных, однако степень включения [³H]тимидина в различных образцах варьировала. В среднем при культивировании клеток в концентрации 2 млн/мл наблюдаемое максимальное включение [³H]тимидина на 3-и сут соответствовало 20-кратному увеличению синтеза ДНК по сравнению с первыми сутками (рис. 1). Последующее его снижение до начального уровня наблюдалось на 5—6-е сут. В морфологическом отношении при культивировании лейкозных лимфоцитов к

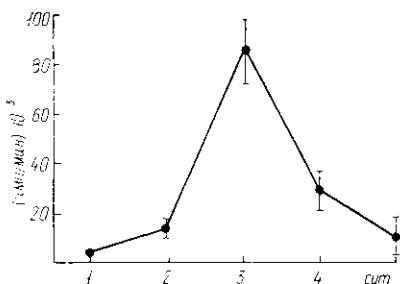


Рис. 1. Включение [³H]тимидина в ДНК лейкозных лимфоцитов при культивировании *in vitro* в бессывороточной среде Игла без добавления экзогенных ФР и митогенной стимуляции. Лимфоциты инкубировали в 2 мл среды Игла при концентрации клеток $2 \cdot 10^6$ в 1 мл

Fig. 1. [³H]thymidine incorporation into DNA of leukemic lymphocytes cultured in the serum-free Eagle medium in the absence of exogenous growth factors and mitogenic stimulation. Lymphocytes were plated at concentration of 2×10^6 cells/ml

48—72 ч инкубации отмечалось увеличение размеров клеток, формирование агрегатов, наблюдались единичные митозы (данные не представлены).

По современным представлениям, пролиферацию клеток в бессывороточной среде можно объяснить либо выделением в среду аутоstimулирующих ФР, либо присутствием автономно функционирующего внутриклеточного регуляторного механизма. Мы исследовали возможность синтеза ФР лейкозными лимфоцитами. Если лимфоциты секретируют ФР, то их концентрация в среде определяется количеством клеток. Таким образом, вход лейкозных лимфоцитов в митотический цикл и последующий синтез ДНК должны зависеть от концентрации клеток. Исследования кинетики синтеза ДНК показали ярко выраженную зависимость пролиферации от плотности клеток (рис. 2). Лейкозные лимфоциты в культуре с высокой плотностью клеток начинали синтезировать ДНК раньше, чем в культуре малой плотности. В лим-

фоцитах, культивируемых при концентрации ниже $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл, синтез ДНК на 2-е и 3-и сут практически отсутствовал. С другой стороны, если наблюдаемая спонтанная пролиферация зависит от продуцируемых ФР, то удаление ФР сменой среды должно привести к снижению числа клеток, синтезирующих ДНК. Смену среды производили центрифугированием после 24 ч преинкубации. Как видно из рис. 3, включение $[^3\text{H}]$ тимидина в первые сутки после смены среды не отличалось от контроля, но на 2-е сут было значительно ниже. Таким

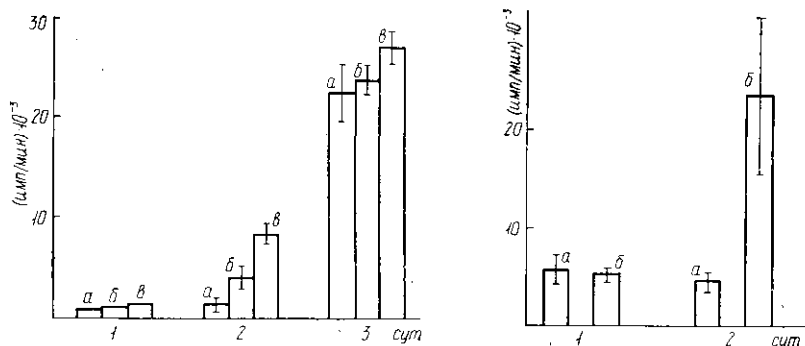


Рис. 2. Кинетика включения $[^3\text{H}]$ тимидина в ДНК лейкозных лимфоцитов в зависимости от концентрации клеток в культуре: 1 (а), 2 (б), 4 млн/мл (в). Включение $[^3\text{H}]$ тимидина измеряли в 1 млн клеток из каждой культуры

Fig. 2. Dependence of kinetics of $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation into DNA of leukemic lymphocytes on cell concentrations in the culture: 1 (a); 2 (б); 4 mill/ml (в). Thymidine incorporation was measured in 1×10^6 cells from each culture.

Рис. 3. Влияние смены среды после 24 ч преинкубации клеток на включение $[^3\text{H}]$ тимидина в ДНК культивируемых лимфоцитов: а — свежая среда, б — без смены среды. Условия культивирования клеток, как в рис. 1

Fig. 3. Influence of the change of culture medium 24 h after cell preincubation on $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation into DNA of cultured lymphocytes: a — fresh medium, б — without the change of culture medium. Cultivation conditions as in Fig. 1.

образом, удаление культуральной среды резко снижало пролиферацию лейкозных лимфоцитов. Это указывает на возможность присутствия активности, стимулирующей пролиферацию, в культуральной среде, содержащей лейкозные лимфоциты.

С целью изучения активности, стимулирующей пролиферацию, к лимфоцитам в начале культивирования добавляли КС, полученную при выращивании в течение 48 ч лейкозных лимфоцитов (4 млн/мл). Обнаружено увеличение включения $[^3\text{H}]$ тимидина более чем в два раза к 40 ч инкубации по отношению к контролю. Отмечается что КС не теряла своей активности после двухмесячного хранения при 4°C .

Чтобы исключить влияние низкомолекулярных метаболитов на синтез ДНК лейкозными лимфоцитами, КС диализовали. Нами установлено, что диализ среды практически не менял ее активности. Это указывает на присутствие в ней ростстимулирующих веществ биополимерной природы, для выяснения которой КС была подвергнута нагреванию и протеолизу. Прогревание КС до 80°C в течение 30 мин не меняло ее активности (125%), однако после нагревания до 100°C она утрачивалась (20%). С другой стороны, активность, стимулирующая пролиферацию, полностью исчезала (—15%) после воздействия трипсином (100 мкг/мл, 2 ч, 37°C). Следует отметить, что внесение трипсина в среду резко снижало включение $[^3\text{H}]$ тимидина как в контрольных культурах, так и в клетках, инкубируемых в КС. Ингибитор трипсина из соевых бобов (100 мкг/мл) снимал подавляющий рост эффект трипсина. Сам ингибитор не влиял на пролиферацию клеток (остаточная активность составляла 129%), как и центрифугирование при 35 000 g в течение 2 ч (107%).

Полученные данные указывают на способность лейкозных лимфо-

цитов при их культивировании в бессывороточной среде выделять рост-стимулирующие факторы белковой природы.

Известно, что лимфоциты крови больных ХЛЛ людей спонтанно не пролиферируют и слабо отвечают на стимуляцию различными митогенами [15]. Есть указания на моноклональную природу ХЛЛ лимфоцитов. Общепринято, что лейкозные клетки пролиферируют в лимфоидных органах как менее созревшие клетки, которые дифференцируются до некоторой степени и затем выходят в циркуляцию [15, 16]. Однако имеются единичные данные о повышенном включении [³H]тимидина в ДНК лимфоцитов периферической крови больных ХЛЛ людей [17, 18]. С другой стороны, повышенный синтез ДНК наблюдался в лимфоцитах крови крупного рогатого скота, больного ХЛЛ, при их культивировании в средах, содержащих эмбриональную сыворотку [19—21]. Известно также, что при культивировании лейкозных лимфоцитов крупного рогатого скота наблюдается активация продукции и выделение вирусных частиц [20], которые согласно гипотезе рецепторно-опосредованного лейкомогенеза [22] могли бы через антиген-специфические рецепторы и (или) рецепторы ФР индуцировать пролиферацию клеток. Так как центрифугирование КС при 35 000 g (2 ч) не меняло ее активности, то последняя в нашем случае, по всей очевидности, не связана с вирусными частицами. Полученные результаты соответствуют имеющимся в литературе данным о продукции растворимых ФР клеточными линиями В-лимфоидного ряда различного неопластического происхождения [23, 24], которые могут обуславливать аутоstimуляцию пролиферации.

Таким образом, показанные нами пролиферация клеток первичной культуры лейкозных лимфоцитов в бессывороточной среде, зависимость начала синтеза ДНК от плотности клеток, а также устойчивая к температуре, недиаализуемая и чувствительная к протеолизу активность, стимулирующая пролиферацию в кондиционированной культивируемыми лейкозными лимфоцитами среде, указывают на способность циркулирующих лимфоцитов при ХЛЛ вырабатывать ФР и на возможность отвечать на их воздействие пролиферацией. Процесс лимфомогенеза при ХЛЛ можно объяснить продукцией аутоstimулирующих ФР лейкозными клетками.

GROWTH PROMOTING ACTIVITY IN CULTURE OF SPONTANEOUS PROLIFERATING LEUKEMIC LYMPHOCYTES

A. L. Kalvelyte, L. J. Pabrėžaitė, M. R. Valius, K. V. Konstantinavičius

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Lithuanian SSR, Vilnius

Summary

It is shown that leukemic lymphocytes from the peripheral blood of bovine with chronic lymphocytic leukemia proliferate in the serum-free Eagle medium in the absence of exogenous growth factors and mitogenic stimulation. The nondialyzable, thermostable, trypsin sensitive growth promoting activity is determined in the culture medium conditioned by leukemic cells. The results suggest that circulating leukemic lymphocytes are capable of elaborating growth factors to which they can respond.

1. *Bradshaw R. A., Sporn M. B.* Polypeptide growth factors and the regulation of cell growth and differentiation // *Fed. Proc.*—1983.—42, N 9.—P. 2590—2591.
2. *Thomas K. A.* Protein growth factors // *Annu. Repts Med. Chem.*—1982.—17.—P. 219—228.
3. *Ozane B., Wheeler T., Kaplan P. L.* Cells transformed by RNR and DNA tumor viruses produce transforming factors // *Fed. Proc.*—1982.—41, N 13.—P. 3004—3007.
4. *Bowen-Pope D. F., Vogel A., Ross R.* Production of platelet-derived growth factor-like molecules and reduced expression of platelet-derived growth factor receptors accompany transformation by a wide spectrum of agents // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81, N 5.—P. 2396—2400.
5. *Sporn M. B., Roberts A. B.* Autocrine growth factors and cancer // *Nature.*—1985.—313, N 6005.—P. 745—747.

6. Weiss R. Oncogenes and growth factors // *Ibid.*—1983.—304, N 5921.— P. 12—16.
7. Heldin C. H., Westermark B. Growth factors: mechanisms of action and relation to oncogenes // *Cell.*—1984.—37, N 1.— P. 9—20.
8. Ruscetti F. W., Gallo R. C. Human T-lymphocyte growth factor: regulation of growth and function of T-lymphocytes // *Blood.*—1981.—57, N 3.— P. 379—394.
9. Schreier M. H. Interleukin-2 and its role in the immune response // *Triangle.*—1984.—23, N 3/4.— P. 141—152.
10. Muraguchi A., Kehrl J. H., Fauci A. S. Activation, proliferation and differentiation of human B lymphocytes // *Lymphokines.*—New York: Acad. press, 1985.—Vol. 10.— P. 75—96.
11. Kalvelyte A., Pabrezaite L. Spontaneous DNA synthesis in serum-free medium by peripheral blood lymphocytes of bovine with chronic lymphocytic leukemia // 13th Int. Congr. Biochem.: Abstr.—Amsterdam, 1985.— P. 581.
12. Калвялите А. Л., Пабрежайте Л. Ю., Валюс М. Р. Пролиферация лейкозных лимфоцитов в бессывороточной среде // Культивирование клеток человека и животных: Тез. докл.—Пущино, 1985.— С. 27—28.
13. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood // *Scand. J. Clin. and Lab. Invest.*—1986.—97, Suppl. 1.— P. 77—89.
14. Boyle W. An extension of the Cr-release assay for the estimation of mouse cytotoxicity // *Transplantation.*—1978.—6, N 6.— P. 761—764.
15. Johnstone A. P. Chronic lymphocytic leukaemia and its relationship to normal B lymphopoiesis // *Immunol. Today.*—1982.—3, N 12.— P. 342—348.
16. Stevenson F. K., Smith J. L. Chronic lymphocytic leukaemia and normal B lymphopoiesis // *Ibid.*—1984.—5, N 3.— P. 60—63.
17. Lopez-Sandoval R., Moayeri H., Sokai J. E. In vitro leukocyte thymidine uptake in chronic lymphocytic leukemia // *Cancer Res.*—1974.—34, N 1.— P. 146—150.
18. Moayeri H., Sokai J. E. In vitro leukocyte thymidine uptake and prognosis in chronic lymphocytic leukemia // *Amer. J. Med.*—1979.—66, N 5.— P. 773—778.
19. Characteristics of lymphocyte responses to phytomitogens: comparison of responses of lymphocytes from normal and lymphocytic cows / C. C. Mucoplat, J. Alhaji, D. W. Johnson et al.—// *Amer. J. Vet. Res.*—1974.—35, N 8.— P. 1053—1055.
20. Baliga V., Ferrer J. F. Expression of bovine leukemia virus and its internal antigen in blood lymphocytes // *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*—1977.—156.— P. 388—391.
21. Особенности лимфоидных клеток при экспериментальном и спонтанном лейкозе крупного рогатого скота / В. Л. Кукайн, Л. И. Нагасва, О. И. Брацлавская, Я. С. Ильина // *Стволовые клетки и опухолевый рост.*—Киев: Наук. думка, 1985.— С. 16—22.
22. Weissman I. L., McGrath M. S. Retrovirus lymphomagenesis: relationship of normal immune receptors to malignant cell proliferation // *Curr. Top. Microbiol. and Immunol.*—1982.—98.— P. 103—112.
23. Brooks K. H., Uhr J. W., Vitteta E. S. A B cell growth factor-like activity is secreted by cloned neoplastic B cells // *J. Immunol.*—1984.—133, N 6.— P. 3133—3137.
24. Capacity of B-lymphocytic lines of diverse tumor origin to produce and respond to B-cell growth factors. A progression model for B-cell lymphomagenesis / J. Gordon, P. Aman, A. Rosen et al. // *Int. J. Cancer.*—1985.—35, N 2.— P. 251—256.

Ин-т биохимии АН ЛитССР, Вильнюс

Получено 24.01.87