

О. Г. Федорчук, Г. Д. Льон, Ю. Р. Якшибаєва, Г. В. Горбик,
О. М. Пясковська

Чутливість клітин карциноми легені Льюїса LLC та LLC/R9 до цитотоксичної дії природних кілерних клітин та макрофагів мишей C57BL/6 *in vitro*

(Представлено академіком НАН України В. Ф. Чехуном)

Проведене порівняльне дослідження чутливості клітин вихідного (LLC) та хіміорезистентного (LLC/R9) варіантів карциноми легені Льюїса до несенсибілізованих макрофагів та природних кілерних клітин інтактних мишей C57BL/6 *in vitro*. Показано, що формування резистентності клітин карциноми легені Льюїса до цисплатину супроводжується підвищенням їх чутливості до цитотоксичної дії природних кілерних клітин і зниженням чутливості до цитотоксичної дії макрофагів. Можливою причиною підвищеної чутливості цих клітин до цитотоксичної дії природних кілерів може бути знижений рівень експресії молекул I класу ГКГ. Знижена чутливість клітин хіміорезистентного варіанта до цитотоксичної дії несенсибілізованих макрофагів асоційована з підвищеною здатністю до аутофагії.

Відомо, що біологічні властивості пухлинних клітин впливають на характер взаємодії пухлини та організму, що визначає особливості перебігу пухлинного процесу [1–3]. З одного боку, в процесі росту пухлини відбувається імуноселекція її клітин, здатних уникнути імунного нагляду. Такі клітини характеризуються зниженим рівнем експресії компонентів процесингу і презентації ендогенних антигенів: молекул I класу головного комплексу гістосумісності (ГКГ), компонентів протеасомного комплексу, білків-транспортерів тощо [4]. З іншого — пухлинні клітини виробляють низку чинників, насамперед цитокінів і хемокінів, які модулюють функції ефекторних клітин як уродженого, так і адаптивного імунітету, формуючи в такий спосіб імносупресивне мікрооточення [5].

Карцинома легені Льюїса вважається низькоімуногенною пухлиною [6]. Нами було схарактеризовано два її варіанти: LLC — отриманий із вихідного штаму та LLC/R9 — хіміорезистентний варіант, отриманий після дев'яти курсів хіміотерапії cis-DDP. LLC/R9 у порівнянні з LLC характеризується високою швидкістю росту первинної пухлини, високим ангіогенним та низьким метастатичним потенціалами [7, 8]. Ранні стадії росту LLC/R9, на відміну від таких LLC, супроводжуються гематологічними порушеннями, асоційованими з високим рівнем продукції пухлинними клітинами VEGF [9]. Високий рівень імуноглобуліну G у сироватці крові тварин з LLC/R9 дозволяє припустити більшу імуногенність клітин цього варіанта щодо такої клітин вихідного варіанта [10]. Відомо, що набуття пухлинними клітинами лікарської резистентності в багатьох випадках асоціюється з реверсією їх чутливості до цитотоксичної дії природних кілерних клітин [11, 12].

У даному повідомленні дана оцінка чутливості клітин LLC та LLC/R9 до цитотоксичної дії природних кілерних клітин та макрофагів мишей C57BL/6 *in vitro*.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводили на 20-ти мишах-самцях лінії C57BL/6 віком 2–2,5 міс. з масою 18–22 г розведення віварію (Інститут експерименталь-

ної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України). Всі маніпуляції виконувались, згідно з міжнародними правилами роботи з дослідними тваринами.

Клітинами-ефекторами (КЕ) слугували мононуклеарні лейкоцити селезінки та перитонеальні макрофаги (ПМ) мишей. Мононуклеари виділяли з суспензії клітин селезінки шляхом центрифугування в градієнті щільності (1,077 г/см³) фікол-верографіну. Для отримання ПМ у черевну порожнину тварин вводили 5 мл середовища 199 ("Sigma", США) з гепарином (5 Од/мл) з подальшим проведенням масажу передньої стінки черевної порожнини впродовж 10 хв. Потім відбирали перитонеальний ексудат, що утворився, і ще двічі промивали черевну порожнину свіжими порціями середовища 199. Отриману суспензію клітин двічі відмивали за допомогою центрифугування (200 g, 10 хв), суспендували в 1 мл середовища RPMI 1640 ("Sigma", США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (ЕТС, "Sigma", США), розливали аліквотами по 3,5 мл у пластикові чашки Петрі діаметром 6 см та інкубували впродовж 45 хв у термостаті при 37 °С. Суспензію неадгезованих клітин зливали та двічі обережно промивали чашки Петрі розчином Хенкса ("Sigma", США). Далі вливали розчин Хенкса з 0,02% ЕДТА і переносили чашки Петрі на лід (10–15 хв). Після цього змивали з дна фракцію адгезованих клітин, переважно представлених ПМ. Суспензію ПМ осаджували шляхом центрифугування (200 g, 10 хв) та суспендували в повному середовищі культивування такого складу: середовище RPMI 1640, 10% ЕТС, 2 ммоль/л L-глутаміну і 40 мкг/мл гентаміцину сульфату. Підраховували кількість життєздатних ПМ і доводили до концентрації $1 \cdot 10^6$ кл./мл.

Клітинами-мішенями (КМ) слугували LLC, LLC/R9 та чутлива до цитотоксичної дії природних кілерних клітин мишей лінія YAC-1 як контроль [13]. КМ культивували в повному середовищі при 37 °С у вологій атмосфері 5% CO₂.

Цитотоксичну активність ефекторних клітин імунної системи визначали методом точної цитофлуориметрії як описано в науковій публікації [14]. Для цього мічені 5(6)-карбоксіфлуоресцеїндіацетат-сукцинілміділ ефіром ("Fluka", Німеччина) КМ та КЕ вносили в лунки 96-лункового круглодонного планшета в об'ємі 200 мкл повного культурального середовища у співвідношенні 40 : 1, 20 : 1 або 10 : 1. Після центрифугування (50 g, 5 хв) клітини інкубували впродовж 4 год (мононуклеари селезінки) або 18 год (ПМ) при 37 °С у вологій атмосфері 5% CO₂. По закінченні інкубації суспензію клітин переносили в цитометричні пробірки, додавали пропідій йодид ("Fluka", Німеччина) у кінцевій концентрації 2,5 мкг/мл.

Підрахунок мертвих КМ проводили за допомогою проточного цитофлуориметра FACScan ("Becton Dickinson", США) за допомогою програми "Cell Quest". Цитотоксичну активність оцінювали з використанням індексу цитотоксичності (Щ, %):

$$\text{Щ} = \frac{D - K}{Z - K} \cdot 100\%,$$

де D — кількість мертвих КМ в дослідній пробі (КЕ + КМ); K — кількість мертвих КМ в контрольній пробі (КМ); Z — загальна кількість КМ, що підрахована.

Для статистичної обробки отриманих даних використовували пакети статистичних програм OriginLab 8.5 та Statistica 8.0.

Результати та їх обговорення. Відомо, що цитотоксичну дію проти пухлинних клітин справляють клітини трьох основних популяцій: природні кілерні клітини, M1 — макрофаги та CD8 + цитотоксичні Т-лімфоцити. Клітини перших двох популяцій належать до ефекторів вродженого імунітету та здатні до лізису пухлинних клітин без попередньої

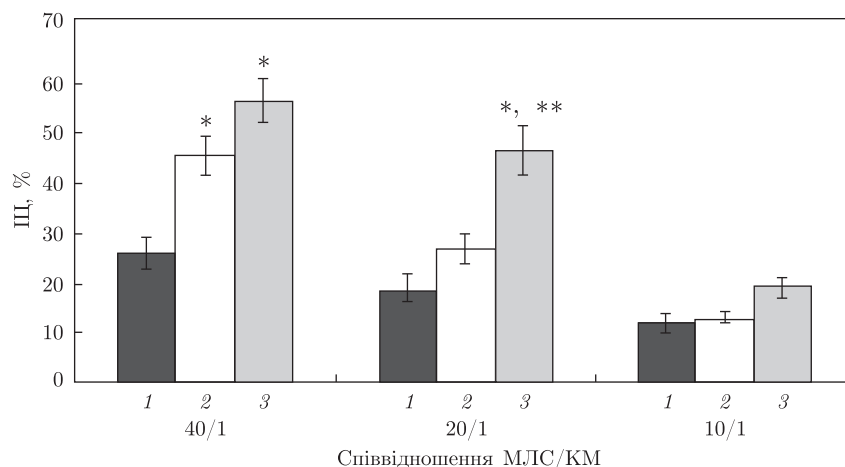


Рис. 1. Чутливість клітин LLC/R9 до цитотоксичної дії мононуклеарних лейкоцитів селезінки.
 Тут і на рис. 2: * — розбіжності при порівнянні з цитотоксичністю проти клітин YAC-1 в аналогічних умовах статистично вірогідні ($p < 0,05$); ** — розбіжності при порівнянні з цитотоксичністю проти клітин LLC в аналогічних умовах статистично вірогідні ($p < 0,05$)

сенсibilізації. Зниження рівня експресії молекул I класу ГКС робить клітини нечутливими до дії ефeкторів адаптивного імунітету (CD8 + цитотоксичних Т-лімфоцитів), однак спричиняє посилення чутливості до цитотоксичної дії природних кілерних клітин, цитотоксичними чинниками яких є перфeрiни та гранзими. Хіміорезистентність пухлинних клітин може супроводжуватися посиленням їх чутливості до цитотоксичної дії природних кілерних клітин [11, 12].

На рис. 1. при порівнянні цитотоксичної активності мононуклеарних лейкоцитів селезінки (МЛС) інтактних мишей лінії C57BL/6 відносно до клітин YAC-1 (1) LLC (2) й LLC/R9 (3) було встановлено, що при співвідношенні KE : KM 40 : 1 цитотоксичність клітин селезінки проти клітин LLC й LLC/R9 була вірогідно вищою (в 1,73 та 2,16 раза відповідно) щодо такої проти клітин YAC-1. При співвідношеннях KE : KM 20 : 1 і 10 : 1 між цитотоксичністю клітин селезінки проти клітин LLC й YAC-1 істотних відмінностей не виявлено. При цьому цитотоксичність проти клітин LLC/R9 була вірогідно вищою при порівнянні з такою проти LLC або YAC-1.

Отже, клітини LLC/R9 характеризуються підвищеною чутливістю до цитотоксичної дії природних кілерних клітин порівняно з клітинами вихідної лінії та YAC-1. Активація цитотоксичної дії природних кілерів відносно пухлинних клітин значною мірою залежить від рівня експресії молекул ГКГ. Отримані результати дозволяють припустити, що клітини хіміорезистентного варіанта карциноми легені Льюїса характеризуються зниженим рівнем експресії молекул I класу ГКГ.

Механізм цитотоксичної дії макрофагів відносно пухлинних клітин істотно відрізняється від такої у природних кілерних клітин. Цитотоксичними чинниками макрофагального походження виступають: фактор некрозу пухлин- α ; трансформуючий фактор росту- β ; реактивні форми кисню й азоту [15].

При дослідженні чутливості клітин YAC-1 (1), LLC (2) й LLC/R9 (3) до дії макрофагів, проілюстрованих на рис. 2, було встановлено, що цитотоксична активність ПМ інтактних мишей проти YAC-1 залежить від співвідношення KE : KM — при збільшенні кількості KE їх цитотоксичність знижується. Стосовно клітин карциноми легені Льюїса спостерігалась

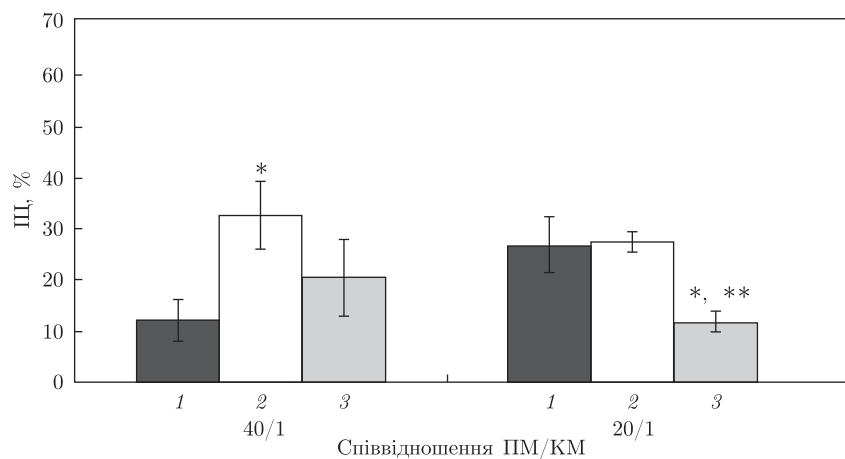


Рис. 2. Чутливість клітин LLC/R9 до цитотоксичної дії перитонеальних макрофагів

зворотна картина — при збільшенні кількості КЕ індекс цитотоксичності ПМ проти клітин LLC й LLC/R9 збільшується. При співвідношенні КЕ : КМ 20 : 1 чутливість клітин хіміорезистентного варіанта карциноми легені Льюїса до цитотоксичної дії ПМ вірогідно знижується у порівнянні з такою клітин вихідної лінії.

Зважаючи на біологічні особливості клітин LLC/R9 (високий рівень продукції VEGF, підвищена швидкість споживання глюкози та високий рівень індукованого гіпоксією апоптозу, можна припустити, що вони здатні пригнічувати цитотоксичну активність макрофагів і/або поляризувати їх до толерогенної протизапальної дії.

Іншим з можливих пояснень резистентності клітин-мішеней LLC/R9 до цитотоксичної дії макрофагів черевної порожнини можуть бути особливості захисту їх від продуктованих макрофагами активних форм кисню та оксиду азоту. Відомо, що одними з основних мішеней реактивних форм кисню в злоякісно трансформованій клітині є лізосоми. Оксидативний стрес спричиняє дестабілізацію мембрани лізосоми, вивільнення лізосомальних ферментів і ушкодження клітини. З метою захисту від тривалого оксидативного стресу в пухлинній клітині, як правило, активується процес аутофагії. При цьому тривалий оксидативний стрес призводить до так званої аутофагічної загибелі клітини, яка класифікується на сьогодні як споріднений апоптозу вид програмованої клітинної загибелі [16]. У попередніх дослідженнях нами було показано підвищену здатність клітин LLC/R9 до аутофагії як в умовах гіпоксії, так і в умовах нормоксії на фоні метаболічного стресу щодо клітин LLC [7].

Таким чином, формування резистентності клітин карциноми легені Льюїса до цисплатину супроводжується зміною їх чутливості до цитотоксичної дії ефektorів протипухлинного імунітету. При цьому знижена чутливість клітин хіміорезистентного варіанта до цитотоксичної дії несенсибілізованих макрофагів асоційована з підвищеною здатністю до аутофагії. Можливою причиною підвищеної чутливості цих клітин до цитотоксичної дії природних кілерів може бути знижений рівень експресії молекул I класу ГКГ.

1. *Кавецкий П. Е.* Взаимодействие организма и опухоли. — Київ: Наук. думка, 1977. — 243 с.
2. *Осинский С., Ваупель П.* Микрофизиология опухолей. — Київ: Наук. думка, 2009. — 253 с.
3. *Aptsiauri N., Cabrera T., Garcia-Lora A. et al.* MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells // *Int. Rev. Cytol.* — 2007. — **256**. — P. 139–189.
4. *Schreiber R. D., Old L. J., Smyth M. J.* Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion // *Science.* — 2011. — **331**. — P. 1565–1570.

5. Snodgrass M. J., Morahan P. S., Kaplan A. M. Histopathology of the host response to Lewis lung carcinoma: modulation by pyran // J. Natl. Cancer Inst. – 1975. – **55**, No 2. – P. 455–462.
6. Колесник Д. Л. Біологічні властивості модифікованого варіанту карциноми легені Льюїс, асоційовані з пухлинним ангиогенезом: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2010.
7. Pyaskovskaya O. N., Dasyukevich O. I., Kolesnik D. L. et al. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance // Exp. Oncol. – 2007. – **29**, No 3. – P. 197–202.
8. Fedorchuk O. G., Pyaskovskaya O. M., Skivka L. M. et al. Paraneoplastic syndrome in mice bearing high-angiogenic variant of Lewis lung carcinoma: Relations with tumor derived VEGF // Cytokine. – 2012. – **57**, No 1. – P. 81–88.
9. Федорчук О. Г. Імуногенні властивості високо-ангіогенного варіанту карциноми легені Льюїс: зв'язок з метастатичним потенціалом // Мед. хімія. – 2012. – **14**. – С. 5–10.
10. Sugimoto Y., Hirakawa Y., Tanaka N. et al. Transplantability and Sensitivity to Natural Killer Cells of Aclarubicin-resistant Murine Lymphoma // Cancer Res. – 1986. – **46**. – P. 5646–5648.
11. Berezhnaya N. M., Belova O. B., Vinnichuk Y. D., Tarutinov V. I. Expression of E-cadherin in drug resistant human breast cancer cells and their sensitivity to lymphokine-activated lymphocytes action // Exp. Oncol. – 2009. – **31**, No 4. – P. 242–245.
12. Kiessling R., Klein E., Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype // Eur. J. Immunol. – 1975. – **5**, No 2. – P. 112–117.
13. Пинегин Б. В., Ярилин А. А., Симонова А. В. и др. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Пособие для врачей лаборантов. – Москва: Б. и., 2001. – 51 с.
14. Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. Immunology: the immune system in health & disease, 5 ed. – New York: Garlandpress, 2005. – 732 p.
15. Chen Y, McMillan-Ward E., Kong J. et al. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells // Cell Death Differ. – 2008. – **15**, No 1. – P. 171–182.

Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
НАН України, Київ
Національний інститут раку, Київ

Надійшло до редакції 12.12.2013

**А. Г. Федорчук, А. Д. Лен, Ю. Р. Якшибаева, Г. В. Горбик,
О. Н. Пясковская**

Чувствительность клеток карциномы легких Льюиса LLC и LLC/R9 к цитотоксическому действию естественных киллерных клеток и макрофагов мышей C57BL/6 *in vitro*

*Проведено сравнительное исследование чувствительности клеток исходного (LLC) и химиорезистентного (LLC/R9) вариантов карциномы легких Льюиса к несенсибилизированным макрофагам и естественным киллерным клеткам intactных мышей C57BL/6 *in vitro*. Показано, что формирование резистентности клеток карциномы легких Льюиса к цисплатину сопровождается повышением их чувствительности к цитотоксическому действию естественных киллерных клеток и снижением чувствительности к цитотоксическому действию макрофагов. Возможной причиной повышенной чувствительности этих клеток к цитотоксическому действию естественных киллеров может быть пониженный уровень экспрессии молекул I класса ГКГ. Сниженная чувствительность клеток химиорезистентного варианта к цитотоксическому действию несенсибилизированных макрофагов ассоциирована с повышенной способностью к аутофагии.*

O. G. Fedorchuk, A. D. Lyon, Yu. R. Yakshibaeva, G. V. Gorbik,
O. N. Pyaskovskaya

**Sensitivity of Lewis Lung Carcinoma (LLC) and LLC/R9 cells to
cytotoxic action exerted by murine natural killer cells and macrophages
of C57BL/6 mice *in vitro***

The comparative investigation of the sensitivity of primary LLC and drug resistant LLC/R9 cells to natural killer cells and macrophages of C57BL/6 intact mice is performed in vitro. It is shown that the forming of a resistance to cisplatin by LLC cells is accompanied by an increase of their sensitivity to the cytotoxic action of natural killer cells and a decrease of the susceptibility to the cytolytic activity of macrophages. High LLC/R9 cell sensitivity to the cytotoxic action of natural killer cells possibly was caused by a diminished expression of MHC class I molecules. Decreased sensitivity of resistant cells to the cytolysis by nonsensitized macrophages was associated with a high ability to undergo autophagy.