

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СПЛЕНОЦИТОВ КРЫС И МЫШЕЙ НА МОНОСЛОЙНЫЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ГЕПАТОМ

© Н. П. Терюкова,¹ О. Н. Погодина, Г. И. Блинова, В. А. Иванов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: *npter@yandex.ru*

Исследование было предпринято с целью изучения молекулярных механизмов цитотоксического действия естественных киллерных клеток (ЕКК) на адгезионные клеточные линии гепатом крыс и мышей. Одна из поставленных нами задач состояла в рассмотрении возможности использования морфометрического анализа для оценки общей естественной цитотоксической активности эффекторных клеток (ЭК) — спленоцитов — по отношению к культивируемым клеткам-мишеням (КМ), которые формируют конфлюэнтный монослой. Для изучения вопроса о внутривидовой специфичности во взаимодействии ЕКК с КМ при постановке цитотоксических тестов с каждой из гепатом в качестве ЭК использовались спленоциты крыс и мышей СЗНА. Мы показали, что клетки двух монослойных культур крысиных гепатом — НТС и Зайдела — являются чувствительными к цитолизу, опосредованному спленоцитами крыс, но проявляют устойчивость к ЕКК мышей. При этом мягкая предобработка спленоцитов крысы 0.5%-ным параформальдегидом (ПФ), блокирующая экзоцитоз перфорина и гранзимов из азурофильных гранул ЭК, приводила к практически полному подавлению их цитотоксической активности только по отношению к клеткам-мишеням гепатомы Зайдела и не влияла на лизис другой мишени — клеток НТС. Из полученных результатов следует, что спленоциты крыс опосредуют свои литические функции по отношению к тестируемым линиям КМ различными путями: в случае гепатомы НТС эффекторы индуцируют механизм классического апоптоза через локализованные на поверхности опухолевых клеток «рецепторы смерти», тогда как клетки гепатомы Зайдела подвергаются «летальному удару» преимущественно посредством перфорин-гранзимного экзоцитоза. Представленные данные доказывают, что использование морфометрического анализа при проведении цитотоксического теста на адгезионных клеточных культурах позволяет оценивать общий цитолитический потенциал ЕКК. Монослойные клеточные линии мышинных гепатом — МН-22а и ВWTG3 — в условиях нашего опыта проявляют резистентность к цитотоксическому действию мышинных спленоцитов, но при этом клетки гепатомы МН-22а подвергаются лизису спленоцитами крыс.

Ключевые слова: апоптоз, гепатома, естественные киллерные клетки, лимфоциты, спленоциты, цитотоксическая активность, эффекторные клетки.

Принятые сокращения: ГКГ — главный комплекс гистосовместимости, ЕКК — естественные киллерные клетки, КМ — клетки-мишени, МНК — мононуклеарные клетки, ПФ — параформальдегид, СПК — сыворотка крови плодов коров, ЦИ — цитотоксический индекс, ЭК — эффекторные клетки, ФАК — киназа фокальной адгезии, TNF — фактор некроза опухолей.

Одним из наиболее важных механизмов, осуществляющих жизнеобеспечение организма, является иммунный надзор, главная функция которого — поддержание генетически закрепленного постоянства клеточного состава тканей и соответствующей схемы биосинтетических процессов (Фель, 1987). Среди проявлений иммунного надзора существенное место занимает противоопухолевая защита, которая подразделяется на неспецифический естественный иммунитет и приобретенный специфический (адаптивный) противоопухолевый иммунитет (Lotzová, 1985). Основными исполнителями функций, т. е. эффекторными клетками естественной резистентности являются ЕКК — большие гранулярные лимфоциты, для которых характерно наличие азурофильных гранул, связанных с мембранами и принадлежащих к секреторному аппарату (Manara et al., 1985). Врожденная способность

ЕКК к выполнению своих цитотоксических функций не требует активации и сенсibilизации, что обеспечивает проявление их активности в ранние сроки (4—18 ч) после начала контакта с КМ и позволяет рассматривать эти клетки как «первую линию обороны организма» (Herberman, 1984).

В настоящее время можно говорить о существовании по крайней мере двух основных механизмов лизиса КМ свежесыведенными неактивированными («наивными») ЕКК (Smyth et al., 2005). Первый — это Ca^{2+} -зависимый гранулярный экзоцитоз с выходом цитотоксических белков (перфорина и гранзимов) из азурофильных гранул (Shi et al., 1992). Реактивность перфорин-гранзимного (или некротического) пути цитотоксического действия ЕКК регулируется их ингибирующими и активирующими рецепторами (Diefenbach, Raulet, 2001). Ингибирующие

рецепторы ЕКК проводят четкую дискриминацию между нормальными и потенциально вредными для организма клетками по уровню экспрессии на их поверхности молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса I — взаимодействие с ними подавляет активность ЭК, тогда как низкое содержание или отсутствие молекул ГКГ класса I активирует ЕКК (Kärre et al., 1986). Активирующие рецепторы (Ly49D, Ly49H, NKG2C, NKG2E, KIR2DS, KIR3DS, NKp46, NKp44, NKp30, NKG2D и пр.) ЕКК узнают соответствующие им лиганды на поверхности опухолевых клеток, что приводит к образованию конъюгатов с КМ и направленному выделению перфорина и гранзимов из азурофильных гранул ЕКК в образовавшуюся синаптическую щель (Rolstad et al., 2001; Trapani, 2001). Перфорин (цитотоксин) встраивается в мембрану КМ, образуя трансмембранные поры. Гранзимы составляют семейство структурно-родственных сериновых протеаз с различной субстратной специфичностью, которые экспрессируются исключительно цитотоксическими Т-лимфоцитами и ЕКК. Ранее считалось, что образование пор и вытекание содержимого из КМ являются признаками их некротической гибели. Однако в современной литературе сформировалось представление об индуцированном гранзимами варианте апоптоза опухолевых клеток (Smyth et al., 2001). Показано, что гранзим В играет решающую роль в индукции апоптоза либо непосредственно, либо через активацию различных прокаспаз, индуцируя таким образом фрагментацию ДНК КМ до олигонуклеосомальных фрагментов (Talanian et al., 1997). Гранзим А, скорее, выступает в качестве синергического компонента для гранзима В (Shresta et al., 1995) и в то же время индуцирует каспазозависимую гибель клеток, генерируя одноцепочечные нити ДНК. Однонитевая ДНК образуется также и в результате действия мышинового гранзима С. Вместе с тем следует отметить, что цитолитическое действие гранзима М, значительное содержание которого обнаружено в ЕКК человека, мыши и крысы, не приводит к фрагментации ДНК (Kelly et al., 2004).

Второй механизм лизиса КМ, используемый ЭК естественной резистентности организма, не зависит от присутствия в системе Ca^{2+} , осуществляется без освобождения из ЕКК цитотоксических белков и не приводит к повреждению плазматических мембран КМ. Это классический механизм апоптоза, который запускается взаимодействием лигандов семейства фактора некроза опухолей (TNF), т. е. «лигандов смерти» ЕКК, таких как мембранно-связанные или секретируемые молекулы FasL (CD95, Apo1), TNF- α , TRAIL (Apo2) и пр., с так называемыми «рецепторами» смерти — трансмембранными белками плазматических мембран КМ, принадлежащими к суперсемейству рецепторов TNF. Активация этих молекул приводит к лигированию их внутрицитоплазматических консервативных «доменов смерти» с определенными адаптерными молекулами, последовательной активации каспазного энзиматического каскада и в конечном счете к конденсации хроматина, фрагментации ядра и гибели клетки (Nagata, Golstein, 1995; Wiley et al., 1995; Cargon et al., 1999). Установлено, что TNF-лиганды конститутивно экспрессируются ЕКК, выделенными из фракции мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови человека (Kashii et al., 1999). Так, из 11 исследованных представителей этого суперсемейства большинство, такие как TNF, LT- α , LT- β , FasL, CD27L, CD30L, OX40L и TRAIL, были найдены в неактивированных ЕКК как на уровне мРНК-транскриптов, так и на поверхности интакт-

ных или пермеабелизованных ЭК. Именно эти «лиганды смерти», взаимодействуя с соответствующими рецепторами на поверхности клеток солидных опухолей, резистентных к перфоринзависимому цитотоксическому действию ЕКК, запускают терминальный сигнал, ведущий к апоптозу КМ. Так, если ЕКК-опосредованный перфорин-гранзимный путь гибели показан главным образом в отношении некоторых культивируемых клеток лейкемии, таких как K562 и Molt4, то перфориннезависимый механизм — в отношении клеток лейкемии Daudi и 25 клеточных линий, происходящих от клеток солидных опухолей (Vujanovic et al., 1996). Регуляция перфориннезависимого цитотоксического пути исследована недостаточно, однако показано, что присутствие на поверхности КМ молекул ГКГ класса I ингибирует развитие апоптозного процесса (Wallin et al., 2003).

Безусловно, представленная здесь схема цитотоксического действия ЕКК на опухолевые клетки значительно упрощена. ЕКК человека и животных, выделенные из разных органов и (или) находящиеся на разных стадиях дифференцировки, могут использовать различные механизмы цитолиза опухолевых клеток. Например, для фенотипически незрелых $CD161^{+}56^{-}$ «наивных» ЕКК человека характерна TRAIL-зависимая цитотоксичность, тогда как зрелые $CD56^{+}$ ЕКК индуцируют FasL- или перфоринопосредованную гибель КМ (Zamai et al., 1998). Мононуклеарные клетки, изолированные из печени мышей С3Н, содержат небольшую субпопуляцию (5.5 %) TRAIL-экспрессирующих клеток, тогда как субпопуляции МНК, изолированные из селезенки или ЕКК, изолированные из костного мозга или лимфатических узлов мышей, не экспрессируют TRAIL (Takeda et al., 2001). Отметим также еще один из возможных механизмов ЕКК-опосредованного апоптоза опухолевых клеток. Показано, что 14-аминокислотная последовательность, названная ТКД, поверхностных белков теплового шока HSP70 обеспечивает не только специфическое узнавание и связывание ЕКК с КМ, но и поступление гранзима В внутрь клетки, запуская без участия перфорина гранзим В-опосредованную апоптотическую гибель HSP70-позитивных опухолевых клеток (Multhoff et al., 1997, 1999; Multhoff, 2002; Gross et al., 2003).

Для изучения цитотоксического действия ЕКК на КМ разработаны разнообразные методы и подходы, основанные на применении изотопов и проточной цитометрии, флуоресцентных меток, красителей, ферментов, антител и пр., подобраны условия, позволяющие оценивать количественные параметры и тонкие механизмы взаимодействия клеток (Numata et al., 1980; Neville, 1987; Chang et al., 1993; Hussain et al., 1993; Hoves et al., 2003; Kasatori et al., 2005). На протяжении многих лет активность ЕКК рассматривалась как важный индикатор способности организма бороться с вирусной инфекцией или опухолевыми заболеваниями, для оценки эффективности проводимых терапевтических мероприятий, в прогностических целях и т. п. Для решения этих задач были разработаны стандартные и относительно простые тесты для определения цитотоксической активности ЕКК с использованием в качестве мишеней клеток миелоидной лейкемии человека K562, меченных ^{51}Cr , ^{125}I -дезоксигуанидином, 3H -уридином и пр. Цитотоксическую активность лимфоцитов определяли по величине цитотоксического индекса (ЦИ), характеризующего долю погибших клеток в результате литического воздействия на них выделенных из эф-фекторов пре-дсуществующих медиаторов, т. е. по коли-

честву освободившейся из клеток метки (Wahlberg et al., 2001).

Современные представления о существовании второго механизма ЕКК-опосредованной гибели КМ, не связанного с лизисом их плазматической мембраны, привели к разработке иных подходов, позволяющих оценивать долю клеток, погибших путем классического апоптоза. Так, JAM-тест основывается на способности стекловолоконных фильтров задерживать интактную ДНК опухолевых клеток и легко пропускать фрагментированную, меченную ^3H -тимидином ДНК, образовавшуюся в результате активации «рецепторов смерти» КМ растворимыми или мембранно-связанными «лигандами смерти» ЭК (Matzinger, 1991; Hoves et al., 2003; Usharauli et al., 2006). Такие методы, как микроцитотоксический анализ (Wahlberg et al., 2001), морфометрический анализ (Geldhof et al., 2002) или анализ «открепления адгезивных мишеней» (Wang et al., 2004), близки по своей сути и базируются на способности адгезивных клеток, погибающих в результате ЕКК-опосредованного апоптотического сигнала, открепляться от пластика, на котором они были распластаны. Открепившиеся клетки могут быть легко удалены промывкой лунок планшета и использоваться для дальнейшего анализа, а количество оставшихся живых клеток оценивается непосредственно под микроскопом, колориметрически или с помощью компьютерных программ. Эти методы характеризуются высокой чувствительностью, простотой и доступностью, поскольку не требуют дорогостоящего оборудования и радиоактивных изотопов.

Направление наших исследований заключается в изучении тех изменений в составе поверхностного аппарата опухолевых клеток, которые, с одной стороны, формируют их злокачественный фенотип (высокая пролиферативность, подвижность, инвазивность, метастатический потенциал и пр.), а с другой — определяют характер взаимодействия естественных киллеров с КМ. Задача настоящей работы состояла в апробации морфометрического анализа для оценки цитотоксической активности ЕКК и изучения молекулярных механизмов действия спленоцитов крыс и мышей на монослойные культуры клеток гепатом.

Материал и методика

Монослойные культуры КМ крысиной гепатомы НТС и мышинных гепатом МН-22а и BWTG3 получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Адгезивная культура клеток крысиной гепатомы Зайдела выведена нами из клеток асцитной опухоли путем многократных пассажей и отбора прикреплющихся к пластику клеток от флотирующих многоклеточных сфероидов.

В качестве ЭК использовали суспензии нефракционированных спленоцитов, полученные из селезенки беспородных крыс-самцов и мышей СЗНА (питомник «Рапполово» РАМН). Клеточные суспензии освобождали от эритроцитов с помощью гипотонического шока и ресуспендировали в полной ростовой среде следующего состава: RPMI 1640 (MP Biomedicals, LLC), 10 % инактивированной (56 °C, 30 мин) сыворотки крови плодов коровы (СПК) Sus-Biol (Биолот, Санкт-Петербург), 20 мМ НЕРЕС, рН 7.3—7.7 (MP Biomedicals, LLC), 80 мкг/мл гентамицина.

Для блокирования перфорин-гранзимного пути лизиса КМ спленоциты крыс фиксировали 0.5%-ным ПФ в RPMI в течение 20 мин и затем дважды отмывали той же средой. Количество ЭК подсчитывали в камере Горяева, одновременно оценивая их жизнеспособность по окраске 0.2%-ным трипановым синим.

Оценку цитотоксического действия спленоцитов на монослойные культуры клеток гепатом проводили с помощью морфометрического анализа (Geldhof et al., 2002), постановку которого изменили с учетом наших задач и возможностей. Так, опухолевые клетки высевали в лунки 24-луночных планшетов фирмы Costar (США) из расчета $(40-70) \cdot 10^3$ кл./мл в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % СПК и 80 мкг/мл гентамицина, выращивали в течение 3—6 сут в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °C до образования конфлюэнтного монослоя. Затем КМ дважды промывали средой и к ним добавляли спленоциты в 1 мл полной ростовой среды так, что соотношение эффекторов к мишеням в отдельных экспериментах составляло 1 : 1, 2 : 1, 4 : 1, 5 : 1, 10 : 1, 25 : 1 или 50 : 1. Каждый вариант опыта повторяли 3—4 раза. Через 4 или 24 ч совместного культивирования спленоциты и погибшие, т. е. открепившиеся от пластика, опухолевые клетки удаляли промывкой лунок средой. Оставшиеся прикрепленные клетки окрашивали 0.2%-ным R250 кумасси, приготовленным на фиксирующем растворе (10 % уксусной кислоты и 45 % этанола в дистиллированной H_2O), промывали водой, высушивали планшеты и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата. С помощью компьютерной программы анализа изображений NIH (National Institutes of Health) цветные фотографии переводили в черно-белые и рассчитывали цитотоксический индекс (ЦИ), характеризующий долю неокрашенных участков в пределах клеточного монослоя, т. е. участков, образовавшихся прежде всего в результате ЕКК-опосредованного лизиса КМ. О цитотоксической активности спленоцитов судили по величине ЦИ.

В ряде экспериментов для сопоставления с результатами морфометрического анализа проведено определение цитотоксической активности спленоцитов крысы с использованием стандартного модифицированного ^3H -уридинового теста Хашимото и Судо (Малыгин и др., 1984). Клетки крысиной гепатомы Зайдела выращивали в лунках 24-луночного планшета до получения конфлюэнтного монослоя, как описано выше, затем дважды отмывали средой без СПК и вносили по 0.4 мл среды, содержащей 5 мкл/мл ^3H -уридина (37 МБк/мл; «Изотоп», Санкт-Петербург). КМ инкубировали 1.5 ч в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °C и дважды отмывали средой. Затем к КМ добавляли спленоциты, суспендированные в полной ростовой среде с 5 мкг/мл РНКазы. Соотношение ЭК к КМ в лунках составляло примерно 25 : 1. После 24-часовой инкубации клетки суспендировали в лунках механическим путем и клеточную суспензию пропускали через бумажные фильтры с помощью вакуумного насоса. Фильтры последовательно промывали физиологическим раствором, 5%-ной трихлоруксусной кислотой и спиртом. Радиоактивность высушенных фильтров определяли, помещая их в вials со сцинтилляционной жидкостью, в счетчике радиоактивных импульсов LS8100 (Beckman). Результаты представляют собой средние величины из 4 параллельных определений. О цитотоксической активности спленоцитов судили по ЦИ, который рассчитывали по формуле $\text{ЦИ} \% = 100 (K - \text{Э}) / K$, где К и Э — радиоактивность КМ, инкубированных без спленоцитов (контроль) и со спленоцитами (эксперимент) соответственно.

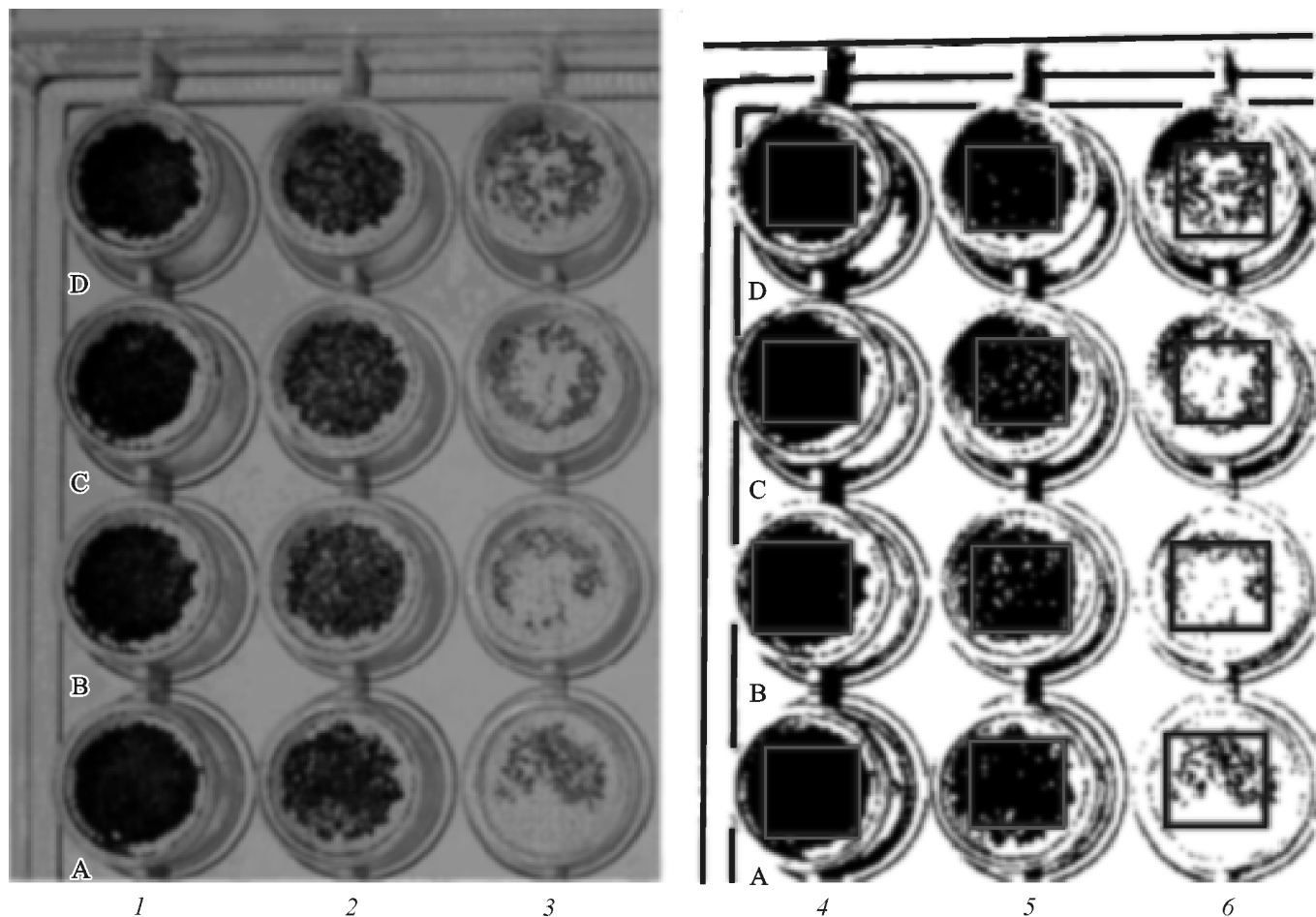


Рис. 1. Определение цитотоксической активности спленоцитов крыс в отношении клеток монослойной культуры гепатомы Зайдела с помощью морфометрического анализа.

Адгезивную культуру клеток гепатомы Зайдела выращивали в 24-луночных планшетах до образования конфлюэнтного монослоя. Затем клетки промывали средой DMEM и продолжали инкубацию клеток-мишеней (КМ) в полной ростовой среде без эффекторных клеток (ЭК) — спленоцитов (1, 4) или с добавлением спленоцитов при соотношениях ЭК / КМ 5 : 1 (2, 5) и 10 : 1 (3, 6). Через 24 ч инкубации погибшие клетки удаляли, лунки промывали и оставшиеся прикрепленные (живые) КМ фиксировали, окрашивали и фотографировали (1—3). С помощью компьютерной программы анализа изображений цветной цифровой фотоснимок планшета преобразовывали в черно-белый и рассчитывали цитотоксический индекс по доле участков лизиса КМ, измеряя неокрашенные зоны в пределах клеточного монослоя (4—6). Каждый вариант соотношения ЭК / КМ повторяли 4 раза.

Результаты

Цитотоксическое действие нефракционированных спленоцитов крыс и мышей на клетки монослойных культур гепатом оценивали с помощью морфометрического анализа. Для этого КМ выращивали в лунках планшета до получения конфлюэнтного монослоя (около $3 \cdot 10^5$ кл. на лунку), добавляли спленоциты и об их цитотоксической активности судили через определенный период времени по освободившейся от клеток поверхности лунок, т. е. по участкам лизиса КМ. Следует заметить, что отчасти неокрашенные участки могут являться следствием недостаточной конфлюэнтности монослоя и спонтанной гибели клеток. На рис. 1 представлена цифровая фотография с изображением планшета с фиксированными и окрашенными клетками гепатомы Зайдела после 24-часовой инкубации без спленоцитов (контроль) и в присутствии спленоцитов при соотношениях ЭК / КМ 5 : 1 и 10 : 1. В контроле опухолевые клетки образуют 100%-ный конфлюэнтный монослой, который по мере увеличения соотношения ЭК / КМ постепенно нарушается, формируя об-

ширные пятна лизиса КМ. Путем последовательной компьютерной обработки цветное изображение планшета преобразовывали в черно-белое, позволяющее рассчитать ЦИ спленоцитов по доле неокрашенных участков.

Цитотоксическую активность спленоцитов крыс в отношении клеток монослойных культур крысиных гепатом НТС и Зайдела оценивали в 4- и 24-часовых тестах. Соотношения эффекторов к мишеням составляли 5 : 1, 10 : 1 и 25 : 1; результаты репрезентативных экспериментов представлены графически на рис. 2. Отметим, что ЦИ крысиных спленоцитов в 4-часовом тесте значительно варьировал (особенно для клеток гепатомы НТС). Поскольку работа проводилась на нелинейных животных, по-видимому, эти колебания отражают индивидуальные особенности крыс. Но в целом для обеих гепатом существует общая тенденция — ЦИ спленоцитов крыс возрастает по мере увеличения соотношения ЭК / КМ и продолжительности контакта клеток. Следует отметить более высокую чувствительность клеток гепатомы НТС к цитотоксическому действию ЕКК в обоих временных интервалах вплоть до 100 % их удаления с поверхности лунок

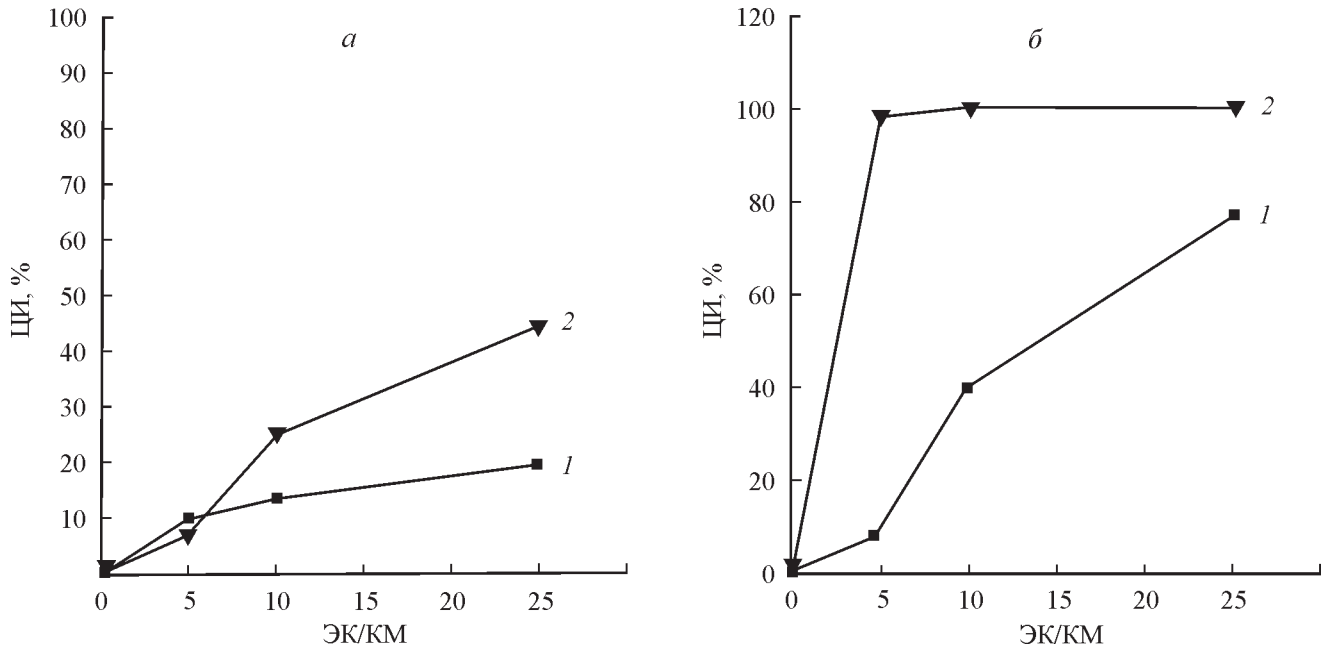


Рис. 2. Цитотоксическое действие эффекторных клеток (ЭК) — спленоцитов крыс на клетки-мишени (КМ) гепатом Зайдела (1) и НТС (2) при различных соотношениях ЭК/КМ и времени их совместной инкубации.

Увеличение соотношения ЭК/КМ и времени инкубации приводит к возрастанию цитотоксического индекса (ЦИ) спленоцитов в отношении КМ. а, б — время совместной инкубации клеток 4 и 24 ч соответственно.

при 24-часовой инкубации и соотношениях ЭК/КМ 10 : 1 и 25 : 1 (рис. 2, б). Такая массовая гибель клеток НТС, по-видимому, объясняется слишком высоким содержанием ЭК в системе. Оптимальные условия для лизиса этих опухолевых клеток создаются при более низких соотношениях ЭК/КМ — 1 : 1, 2 : 1 и 4 : 1, при которых ЦИ спленоцитов составляет 7,00, 9,17 и 37,13 % соответственно (рис. 3). Спленоциты крысы наряду с крысиными гепатомами опосредуют гибель клеток мышинной гепатомы МН-22а, цитолиз которых значительно варьирует, но

после 24-часовой инкубации при соотношении ЭК/КМ 25 : 1 может достигать 81 %.

Иная ситуация складывается с мышинными спленоцитами: монослойные культуры мышинных гепатом МН-22а и ВWTG3, а также обе крысиные гепатомы проявляют резистентность в отношении ЕКК в обоих интервалах времени и при соотношениях ЭК/КМ вплоть до 50 : 1.

Для того чтобы определить механизм, приводящий к гибели клетки крысиных гепатом при их инкубации с крысиными ЕКК, мы использовали такой подход, как мягкая предобработка спленоцитов ПФ. При этом сохраняются структура и функции поверхностных рецепторов, но утрачивается способность к гранулярному экзоцитозу и как следствие ингибируется перфорин-гранзимный механизм лизиса КМ (Kim et al., 2003). В нашей работе спленоциты крыс были предобработаны 0,5%-ным ПФ в течение 20 мин и затем дважды отмыты средой. Окрашивание 0,2%-ным раствором трипанового синего выявляет в среднем около 31 % нежизнеспособных клеток среди предобработанных ПФ, тогда как среди интактных спленоцитов — не более 1,5 %. Как показано на рис. 4, а, 24-часовая инкубация интактных спленоцитов с клетками гепатомы Зайдела при соотношениях 10 : 1 и 25 : 1 приводит к гибели 84,8 и 99,3 % КМ, а в случае фиксированных ПФ спленоцитов с теми же клетками — 1,7 и 2,9 % соответственно. Совсем иная картина наблюдается с клетками ге-

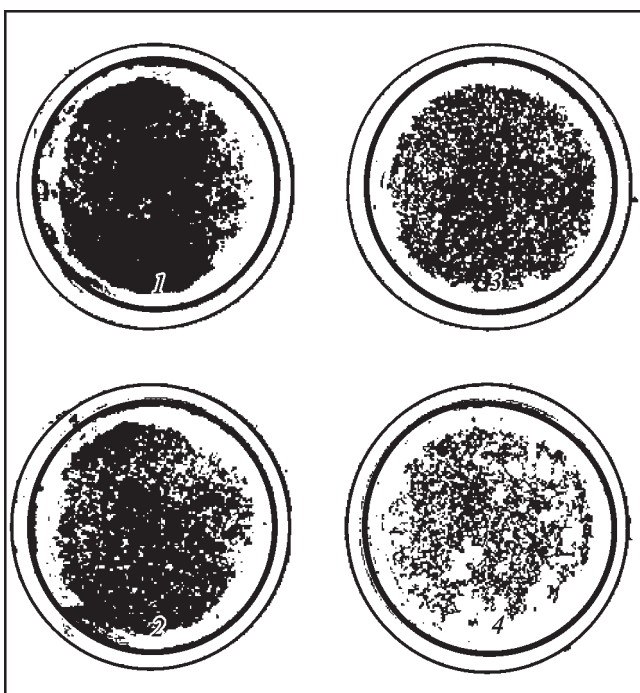


Рис. 3. Зависимость лизиса клеток-мишеней (КМ) монослойной культуры крысиной гепатомы НТС эффекторными клетками (ЭК) — спленоцитами крыс при различных соотношениях ЭК/КМ.

КМ инкубировали 24 ч в полной ростовой среде без спленоцитов (1) и со спленоцитами крыс при соотношениях ЭК/КМ 1 : 1 (2), 2 : 1 (3) и 4 : 1 (4). Лизис клеток, т. е. доля неокрашенных участков, монослойной культуры клеток гепатомы НТС возрастает с увеличением соотношения ЭК/КМ.

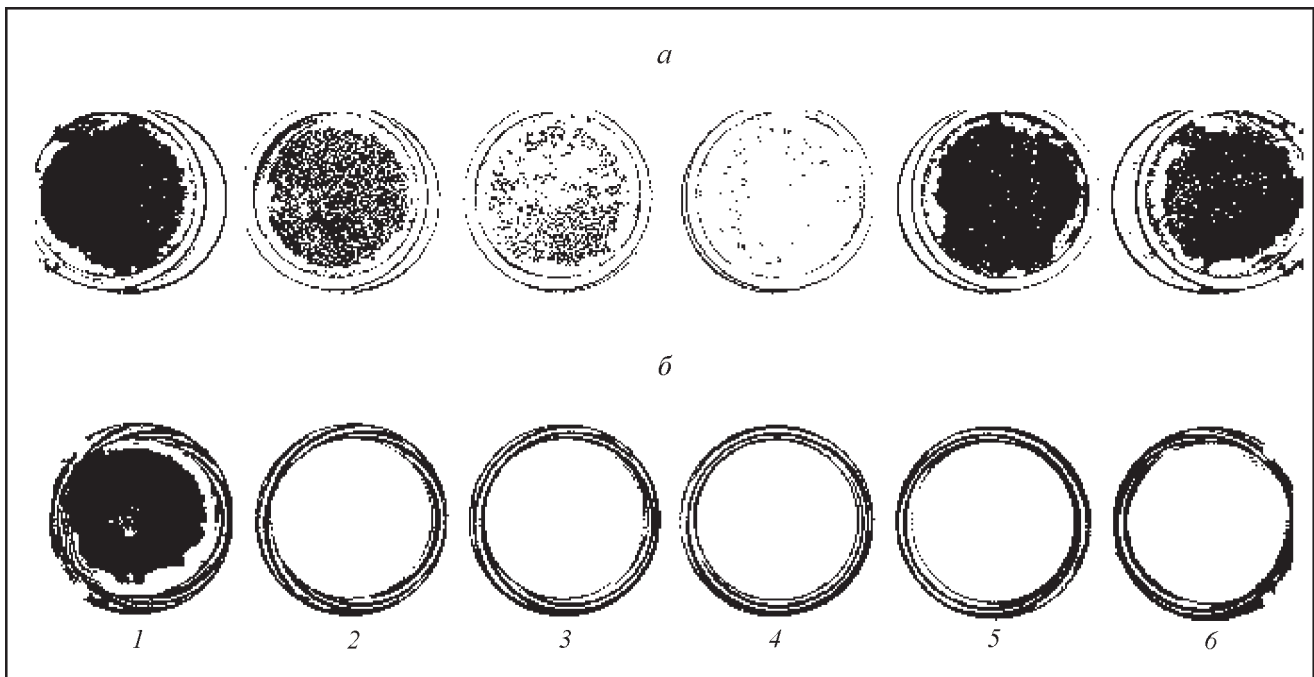


Рис. 4. Влияние предобработки параформальдегидом (ПФ) эффекторных клеток (ЭК) — спленоцитов крыс на их цитотоксическую активность в отношении клеток-мишеней (КМ).

В результате 24-часовой совместной инкубации интактные спленоциты (2—4) активно лизируют клетки крысиных гепатом Зайдела (а) и НТС (б). Предварительная обработка спленоцитов 0.5%-ным ПФ ингибирует лизис клеток гепатомы Зайдела (а — 5, б) и не изменяет цитотоксичность ЭК в отношении клеток гепатомы НТС (б — 5, б). Контроль — клетки гепатом, инкубированные без добавления ЭК (1). Соотношения ЭК / КМ составляют 5 : 1 (2), 10 : 1 (3, 5) и 25 : 1 (4, 6).

патомы НТС, лизис которых предобработанными ПФ спленоцитами осуществляется с интенсивностью, свойственной интактным спленоцитам, и в 24-часовом тесте при соотношениях эффекторов к мишеням 10 : 1 и 25 : 1 достигает 100 % (рис. 4, б). Полученные результаты свидетельствуют о том, что спленоциты крысы осуществляют лизис этих опухолевых клеток разными путями: в отношении клеток гепатомы Зайдела — перфорин-гранзимным, а в случае гепатомы НТС — посредством TNF-зависимого апоптоза.

В ряде экспериментов с адгезивными клетками гепатомы Зайдела, чувствительными к гранулярному экзоцитозу, параллельно с проведением морфологического анализа и в тех же условиях мы определяли цитотоксическую активность спленоцитов крыс с помощью стандартного модифицированного ³H-уридинового теста Хашимото и Судо, широко используемого для определения цитотоксичности ЕКК на клетках, лизис которых осуществляется перфорин-гранзимным путем. Судя по предварительным данным, ЦИ спленоцитов крыс в 24-часовом тесте при соотношении эффекторов к мишеням 25 : 1 составляет 19 %, что существенно ниже результатов, полученных с помощью морфометрического анализа.

Результаты проведенного исследования позволяют сделать следующее заключение. Морфометрический анализ является доступным, надежным и достоверным методом для оценки цитотоксической активности спленоцитов по отношению к монослойным клеточным линиям и изучения молекулярных механизмов их взаимодействия с КМ. Свежевыделенные «наивные» спленоциты крыс обладают необходимым потенциалом для цитолиза адгезивных клеток гепатом и крыс, и мышей, тогда как литического действия мышинных спленоцитов на те же КМ в условиях наших

экспериментов мы не обнаружили. Неактивированные «наивные» спленоциты крыс наряду с перфорин-гранзимным путем цитолиза КМ способны индуцировать механизм TNF-зависимого апоптоза, что может быть следствием экспрессии на их поверхности TNF-лигандов. ЕКК-опосредованная гибель клеток гепатомы Зайдела происходит преимущественно путем гранулярного экзоцитоза, а клеток гепатомы НТС — путем классического апоптоза, т. е. морфометрический анализ позволяет оценивать суммарный цитотоксический потенциал ЭК.

Обсуждение

За последние 10—15 лет представления о молекулярных механизмах взаимодействия ЭК системы естественной резистентности организма с КМ принципиально изменились. Оказалось, что для исполнения своих врожденных функций ЕКК недостаточно отсутствия на поверхности aberrантных клеток молекул ГКГ класса I, а требуется наличие лигандов, обеспечивающих взаимное узнавание и связывание пары эффектор—мишень и в конечном итоге опосредующих тот или иной путь гибели.

Вопрос о механизмах ЕКК-опосредованной гибели клеток гепатоцеллюлярных карцином изучен недостаточно. Известно, что гепатоциты в большей степени чувствительны к TNF-опосредованному апоптозу, чем другие клетки организма, а система Fas/FasL выполняет физиологическую роль в апоптозе клеток печени (Galle, Kramer, 1998; Feldmann, 2006). Болезни печени, и в частности гепатоцеллюлярные карциномы, приводят к нарушению регуляции этой системы. В противоположность нормальным гепатоцитам большинство клеток гепатокарцином

вполне устойчивы к TNF-опосредованному апоптозу, индуцированному либо моноклональными антителами к «рецепторам смерти», либо растворимыми «лигандами смерти» (Yano et al., 1996). Между тем, резистентность к TNF-опосредованному апоптозу может являться существенным шагом на пути «ускользания» трансформированных клеток от иммунного надзора организма. В литературе нам встретилось единственное исследование, направленное на выяснение механизмов ЕКК-лизиса культивируемых клеток гепатокарцином человека НерG2 и Нер3В, которые являются Fas⁺ и Fas⁻ соответственно (Kim et al., 2004). Через 4 ч инкубации с фракцией ЕКК человека авторы отмечают отчетливые морфологические признаки смерти большинства клеток обеих линий. При постановке стандартного цитотоксического теста оказалось, что обе клеточные линии активно лизируются ЕКК-опосредованным некротическим путем; в то же время, по данным JAM-теста, основанного на определении степени фрагментации ДНК, ЕКК индуцируют апоптоз в клетках гептомы Нер3В. Мягкая фиксация эффекторов ПФ не оказывает ингибирующего влияния на освобождение ³H-тимидина этими клетками, что позволило авторам предположить существование перфориннезависимого апоптогического механизма гибели клеток Нер3В и затем показать, что взаимодействие клеток осуществляется через мембранные TNF-лиганды ЕКК и поверхностные TNF-рецепторы КМ (в данном случае — TRAIL/TRAIL-рецепторы).

В нашей работе для изучения цитотоксического действия спленоцитов на клетки крысиных и мышиных гепатом использовали суспензии свежeweделенных нефракционированных клеток селезенки беспородных крыс и мышей СЗНА, т. е. наряду с популяцией ЕКК, доля которых в этом органе мышей составляет 3—9 % от всей популяции МНК (Harrington et al., 1997), присутствуют Т-, В-лимфоциты и макрофаги, формирующие замедленный адаптивный (специфический) иммунный ответ. Поскольку активность ЕКК относится к системе естественного (неспецифического) иммунитета, она может быть зафиксирована в ближайшие часы после контакта эффекторов с аберрантными клетками, когда активность других ЭК еще не определяется. Например, среди субпопуляций свежeweделенных МНК человека только ЕКК индуцировали апоптоз клеток карциномы молочной железы MCF-7, тогда как активность Т-, В-клеток и макрофагов не регистрировалась ни в 4-часовом ⁵¹Cr-тесте, ни в 1-часовом ³H-тимидиновом апоптозном тесте (Vujanovic et al., 1996). Также МНК периферической крови доноров после удаления из их состава ЕКК не проявляли спонтанной цитотоксичности ни в отношении клеток K562 в 4-часовом ⁵¹Cr-тесте, ни в отношении клеток карциномы молочной железы BT-20 в 24-часовом микроцитотоксическом тесте (Wahlberg et al., 2001).

Выбор морфометрического анализа для проведения нашего исследования диктовался рядом причин, среди которых важное значение имел тот факт, что и в клинической практике, и в экспериментальной работе важно учитывать весь литический потенциал ЭК. По данным Валберга с сотрудниками (Wahlberg et al., 2001), микроцитотоксический тест, основанный на тех же принципах, что и морфометрический анализ, и выполненный на адгезивных клетках BT-20, устойчивых к ЕКК-лизису в стандартном ⁵¹Cr-тесте, фиксирует снижение функциональной активности лимфоцитов периферической крови больных уже на ранних стадиях рака молочной железы; в то же время при проведении ⁵¹Cr-теста на клетках K562 до-

стоверные различия в уровнях естественной цитотоксичности между этими пациентами и донорами не определяются. Морфометрический анализ ранее применялся авторами метода в работе с лимфокинактированными киллерными клетками и мышинной монослойной линией фибробластоподобных клеток 10T_{1/2} (Geldhof et al., 2002). Принцип метода основан на современных представлениях о роли интегринов в передаче сигналов, необходимых для выживания клеток, от компонентов внеклеточного матрикса в клетку. Разрушение контактов между интегринными и белками внеклеточного матрикса вызывает гибель эпителиальных и эндотелиальных клеток путем апоптоза, или «аноикиса» (апоптоза адгезионных клеток в результате потери контакта с внеклеточным матриксом). Интегрины контактируют с лигандами внеклеточного матрикса в местах фокальной адгезии, где сосредоточены pp125-киназа фокальной адгезии (ФАК) / cSrc-комплекс, Ras и Rho GTPазы, адаптерные белки Cas/Crk, участвующие в начальных этапах передачи сигналов внутри клетки (Guan, 1997). Проведение сигнала начинается со связывания интегринового рецептора с лигандом, что ведет к активации и аутофосфорилированию ФАК по Tyr³⁹⁷. Как оказалось, причина открепления адгезионных клеток от компонентов внеклеточного матрикса заключается в деградации ФАК активированными каспазами на ранних этапах классического апоптоза: уже через 2 ч после добавления Fas-лиганда, TRAIL или других факторов, индуцирующих апоптоз, в культуральной среде обнаруживаются фрагменты ФАК с мол. массами 85 и 77 кДа (Wen et al., 1997). Фрагментация ФАК приводит к разрушению сигнальных путей, опосредованных интегринными, и откреплению клеток от субстрата. При использовании морфометрического метода авторы проводили совместную инкубацию лимфокинактированных киллерных клеток с фибробластоподобными клетками 10T_{1/2} в культуральных чашках 10 см² при соотношениях ЭК / КМ от 0.75 : 1 до 6 : 1 и через 2 ч отмечали гибель КМ и их открепление от пластика. После удаления всех флолирующих клеток расчет ЦИ ЭК проводили с помощью компьютерной программы анализа изображений и для этого обсчитывали порядка 10 полей зрения фиксированных и окрашенных клеток 10T_{1/2}, наблюдаемых под микроскопом. Мы адаптировали метод к нашим условиям и работе с ЕКК, а именно со спленоцитами. Адгезивные клеточные культуры выращивали в 24-луночных планшетах, что позволяет не только работать при более высоких соотношениях ЭК / КМ, но и анализировать несколько параллельных лунок. Кроме того, мы проводили цифровую съемку планшета с последующей компьютерной обработкой большей части окрашенного монослоя, что представляется более объективным подходом. К несомненным достоинствам описываемого метода относятся его простота, доступность, отсутствие необходимости в использовании радиоактивных изотопов или дорогостоящего оборудования и убедительная наглядность.

Полученные нами данные показали, что морфометрический анализ может быть с успехом использован для определения цитотоксической активности ЕКК и изучения молекулярных механизмов действия ЭК на КМ, особенно в 24-часовых тестах, когда активность лимфоцитов достигает более высоких значений и отмечается стабильность результатов. Другие авторы также отдают предпочтение 24-часовому контакту ЭК с КМ, указывая на то, что в отношении прикрепленных мишеней активность лимфоцитов градуально нарастает, достигая максимальных значений через 24 ч (Wahlberg et al., 2001; Wang et al.,

2004). Мы обнаружили высокую чувствительность клеток адгезивных линий крысиных гепатом НТС и Зайдела к токсическому действию ЕКК, но механизмы цитолиза КМ оказались различными: для клеток гепатомы Зайдела — перфорин-гранзимный, а для клеток гепатомы НТС — классический апоптоз. Обращает на себя внимание следующий факт: при постановке стандартного 24-часового ³H-уридинового теста с клетками гепатомы Зайдела при соотношении ЭК/КМ 25 : 1 ЦИ спленоцитов составляет около 19 %, тогда как по данным морфометрического анализа — 78 %, что может объясняться высокой чувствительностью методов, основанных на адгезивных свойствах клеток (Wang et al., 2004). Например, при использовании стандартного ⁵¹Cr-теста для достижения уровня лизиса КМ, сопоставимого с данными морфометрического анализа, соотношение ЭК/КМ должно быть увеличено в 5 раз (Geldhof et al., 2002).

На фоне крысиных спленоцитов, активно лизирующих КМ, неожиданными оказались результаты, полученные со спленocyтaми мышей СЗНА: все тестируемые нами клетки мышиных и крысиных гепатом проявили устойчивость по отношению к цитотоксическому действию спленоцитов мышей. Механизмы резистентности опухолевых клеток к ЕКК-лизису изучены недостаточно, и на этот счет можно высказать лишь некоторые соображения. Как отмечалось выше, ЕКК, выделенные из разных органов человека и животных или находящиеся на разных уровнях дифференцировки, используют различные механизмы для цитолиза КМ. Например, если МНК из печени мышей СЗН содержат небольшую субпопуляцию (5.5 %) TRAIL-экспрессирующих клеток и могут индуцировать апоптоз опухолевых клеток, то субпопуляции МНК, изолированные из селезенки, не экспрессируют TRAIL и соответственно их участие в этом процессе невозможно (Takeda et al., 2001). Отсутствие информации относительно экспрессии этих «лигандов смерти» на поверхности различных субпопуляций ЕКК крыс и мышей СЗНА не позволяет нам однозначно трактовать полученные результаты, но можно предположить, что спленocyтaты крыс экспрессируют TNF-лиганды, а спленocyтaты мышей СЗНА подобно мышам СЗН их не синтезируют. Интересные представления о природе резистентности опухолевых клеток содержатся в статье Стивенсона с соавторами (Stevenson et al., 1989), которые обнаружили обратную корреляцию между потенциалом клеточных мембран гепатоцеллюлярных опухолей человека и их чувствительностью к цитотоксическому действию ЕКК. Опухолевая клетка имеет более низкий трансмембранный потенциал, чем нормальная покоящаяся клетка, и во время гепатоканцерогенеза у крыс мембранный потенциал гепатоцитов снижается от -28 до -15 мВ. Клетки с наиболее высоким мембранным потенциалом оказались практически резистентными к ЕКК-лизису. Выказываются предположения о роли ингибирующих механизмов, низких уровнях экспрессии лигандов на поверхности КМ к активирующим рецепторам ЕКК и пр., однако определенность в этом вопросе отсутствует (Romanski et al., 2005; Hasenkamp et al., 2006).

Список литературы

Мальгин А. М., Погодина О. Н., Чернышева М. Д., Фель В. Я. 1984. Исследование противоопухолевого действия лимфоцитов молодых и гепатэктомированных мышей линии СЗНА. Иммунология. 4 (1) : 46—49.

Фель В. Я. 1987. Иммунореактивность при опухолевом росте. Вopr. онкол. 34 (4) : 99—106.

Caron G., Delneste Y., Aubry J. P., Magistrelli G., Herbaull N., Blaecke A., Meager A., Bonnefoy J. Y., Jeannin P. 1999. Human NK cells constitutively express membrane TNF-alpha (mTNFalpha) and present mTNFalpha-dependent cytotoxic activity. Eur. J. Immunol. 29 : 3588—3595.

Chang L., Gusewitch G. A., Chritton D. B., Folz J. C., Lebeck L. K., Nehlsen-Cannarella S. L. 1993. Rapid flow cytometric assay for assessment of natural killer cell activity. J. Immunol. Methods. 166 : 45—54.

Diefenbach A., Raulet D. H. 2001. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. Immunol. Rev. 181 : 170—184.

Feldmann G. 2006. Liver apoptosis. Gastroenterol. Clin. Biol. 30 : 533—545.

Galle P. R., Kramer P. H. 1998. CD95-induced apoptosis in human liver disease. Semin. Liver. Dis. 18 : 141—151.

Geldhof A. B., De Meyer K., De Baetselier P., Verschuere H. 2002. Morphometric analysis of cytolysis in cultured cell monolayers: a simple and versatile method for the evaluation of the cytotoxic activity and the fate of LAK cells. Lab. Invest. 82 : 105—107.

Gross C., Koelch W., DeMaio A., Arispe N., Multhoff G. 2003. Cell surface bound heat shock protein 70 (HSP70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. J. Biol. Chem. 278 : 41173—41181.

Guan J. L. 1997. Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. Int. J. Biochem. Cell Biol. 29 : 1085—1096.

Harrington N. P., Chambers K. A., Ross W. M., Filion L. G. 1997. Radiation damage and immune suppression in splenic mononuclear cell populations. Clin. Exp. Immunol. 107 : 417—424.

Hasenkamp J., Borgerding A., Wulf G., Uhberg M., Jung W., Dingeldein S., Truemper L., Glass B. 2006. Resistance against natural killer cell cytotoxicity: analysis of mechanisms. Scand. J. Immunol. 64 : 444—449.

Herberman R. B. 1984. Possible role of natural killer cells and other effector cells in immune surveillance against cancer. J. Invest. Dermatol. 83 (Suppl. 1) : 137s—140s.

Hoves S., Krause S. W., Schölmerich J., Fleck M. 2003. The JAM-assay: optimized conditions to determine death-receptor-mediated apoptosis. Methods. 31 : 127—134.

Hussain R. F., Nouri A. M., Olive R. T. 1993. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. J. Immunol. Methods. 160 : 89—96.

Kärre K., Ljunggren H. G., Piontek G., Kiessling R. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy. Nature. 319 : 675—678.

Kasatori N., Ishikawa F., Ueyama M., Urayama T. 2005. A differential assay of NK-cell-mediated cytotoxicity in K562 cells revealing three sequential membrane impairment steps using three-color flow-cytometry. J. Immunol. Methods. 307 : 41—53.

Kashii Y., Giorda R., Herberman R. B., Whiteside T. L., Vujanovic N. L. 1999. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. J. Immunol. 163 : 5358—5366.

Kelly J. M., Waterhouse N. J., Cretney E., Browne K. A., Ellis S., Trapani J. A., Smyth M. J. 2004. Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. J. Biol. Chem. 279 : 22 236—22 242.

Kim H.-R., Park H.-J., Park J. H., Kim S. Y., Kim K., Kim J. 2004. Characteristics of the killing mechanism of human natural killer cells against hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and Hep3B. Cancer Immunol. Immunother. 53 : 461—470.

Lotzová E. 1985. Effector immune mechanisms in cancer. Nat. Immun. Cell Growth Regul. 4 : 293—304.

Manara G. C., de Panfilis G., Ferrari C. 1985. Ultrastructural characterization of human large granular lymphocyte subsets defined by expression of HNK-1 (Leu-7), Leu-11, or both HNK-1 and Leu-11 antigens. J. Histochem. Cytochem. 33 : 1129—1133.

Matzinger P. 1991. The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. J. Immunol. Methods. 145 : 185—192.

Multhoff G. 2002. Activation of natural killer cells by heat shock protein 70. Int. J. Hyperthermia. 18 : 576—585.

- Multhoff G., Botzler C., Jennen L., Schmidt J., Ellwart J., Isseles R. 1997. Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J. Immunol.* 158 : 4341—4350.
- Multhoff G., Mizzen L., Winchester C. C., Milner C. M., Wenk S., Eissner G., Kampinga H. H., Lanmbacher B., Johnson G. 1999. Heat shock protein 70 (HSP70) stimulates proliferation and cytotoxic activity of natural killer cells. *Exp. Hematol.* 27 : 1627—1636.
- Nagata S., Golstein P. 1995. The Fas death factor. *Science.* 267 : 1449—1456.
- Neville M. E. 1987. ⁵¹Cr-uptake assay. A sensitivity and reliable method to quantitate cell viability and cell death. *J. Immunol. Methods.* 99 : 77—82.
- Numata M., Mitsuboshi Y., Nitta K. 1980. A cytotoxicity assay using ³H-uridine and emulsions scintillator. *Gann.* 71 : 715—720.
- Rolstad B., Naper C., Løvik G., Vaage J. T., Ryan J. C., Bäckman-Petersson E., Kirsch R. D., Butcher G. W. 2001. Rat natural killer cell receptor system and recognition of MHC class I molecules. *Immunol. Rev.* 181 : 119—157.
- Romanski A., Bug G., Becker S., Kampfmann M., Seifried E., Hoelzer D., Ottmann O. G., Tonn T. 2005. Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Hematol.* 33 : 344—352.
- Shi L., Kraut R. P., Aebersold R., Greenberg A. H. 1992. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J. Exp. Med.* 175 : 553—566.
- Shresta S., MacIvor D. M., Heusel J. W., Russell J. H., Ley T. J. 1995. Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92 : 5679—5683.
- Smyth M. J., Cretney E., Kelly J. M., Westwood J. A., Street S. E., Yagita H., Takeda K., van Dommelen S. L., Degli-Esposti M. A., Hayakawa Y. 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 42 : 501—510.
- Smyth M. J., Kelly J. M., Sutton V. R., Davis J. E., Browne K. A., Sayers T. J., Trapani J. A. 2001. Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins. *J. Leukoc. Biol.* 70 : 18—29.
- Stevenson D., Binggeli R., Weinstein R. C., Keck J. G., Lai M. C., Tong M. J. 1989. Relationship between cell membrane potential and natural killer cell cytolysis in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 49 : 4842—4845.
- Takeda K., Hayakawa J., Smyth M. J., Kayagaki N., Yamaguchi N., Kakuta S., Iwakura Y., Yagita H., Okumura K. 2001. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat. Med.* 7 : 94—100.
- Talanian R. V., Yang X. H., Turbov J., Seth P., Ghayur T., Casiano C. A., Orth K., Froelich C. J. 1997. Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J. Exp. Med.* 186 : 1323—1331.
- Trapani J. A. 2001. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol.* 2 : reviews 3014.1—3014.7.
- Usharauli D., Rerez-Diez A., Matzinger P. 2006. The JAM test and its daughter P-JAM: simple tests of DNA fragmentation to measure cell death and stasis. *Nat. Protoc.* 1 : 673—682.
- Vujanovic N. L., Nagashima S., Herberman R. B., Whiteside T. 1996. Nonsecretory apoptotic killing by human NK cells. *J. Immunol.* 157 : 1117—1126.
- Wahlberg B. J., Burholt D. R., Kornblith P., Richards T. J., Bruffsky A., Herberman R. B., Vujanovic N. 2001. Measurement of NK activity by the microcytotoxicity assay (MCA): a new application for an old assay. *J. Immunol. Methods.* 253 : 69—81.
- Wallin R. P., Screpanti V., Michaëlsson J., Grandien A., Ljunggren H. G. 2003. Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J. Immunol.* 33 : 2727—2735.
- Wang X., Cai J., Zhong Y., Denham S. A., Terasaki P. I. 2004. Screening of high cytotoxic tumor killer cells using a sensitive adherent target detachment assay. *J. Immunol. Methods.* 295 : 57—65.
- Wen L.-P., Fahrni J. A., Troie S., Guan J.-L., Orth K., Rosen G. D. 1997. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272 : 26056—26061.
- Wiley S. R., Schooley K., Smolak P. J., Din W. S., Huang C. P., Nicholl J. K., Sutherland G. R., Smith T. D., Rauch C., Smith C. A. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 3 : 673—682.
- Yano H., Fukuda K., Haramaki M., Monosaki S., Ogasawara S., Higaki K., Kojiro M. 1996. Expression of Fas and anti-Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *J. Hepatol.* 25 : 454—464.
- Zamai L., Ahmad M., Bennett I. M., Azzoni L., Alnemri E. S., Perussia B. 1998. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRALL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* 188 : 2375—2380.

Поступила 2 XII 2008

THE MORPHOMETRIC ANALYSIS OF CYTOTOXICAL ACTION OF RATS AND MICE SPLENOCYTES AGAINST CONFLUENT MONOLAYER CELL LINES OF HEPATOMAS

N. P. Teryukova,¹ O. N. Pogodina, G. I. Blinova, V. A. Ivanov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: npter@yandex.ru

The present study was aimed to examine the possibility to use of the morphometric analysis for estimation of the total natural cytotoxic activity of rat and mice C3HA splenocytes against the cultured target cells which formed confluent monolayers. By means of this method we have revealed that two rat monolayer hepatoma cell lines — HTC and Zajdela — were sensitive to cytolysis mediated by rat effector cells, but not splenocytes of C3HA mice. The mild pretreatment with 0.5 % paraformaldehyde of the rat splenocytes produced a significant decrease only in the cytotoxic activity against the target cells line Zajdela and don't affect the lysis of the other target HTC cells. These results suggest that the natural cytotoxic rat cells may mediate their lytic functions toward tested target lines by different ways. In the case of HTC cells as the targets the effectors induce «death receptor»-mediated apoptosis, as to target cells Zajdela they deliver lethal hit by perforin-granzyme exocytosis mechanism. The cultured cell monolayers of mice hepatoma — MH-22a and BWTG3 — cells showed under conditions of our experiments the resistance to cytolysis by homologous effector cells; however, the hepatoma MH-22a cells were susceptible to killing mediated by rat cytotoxic splenocytes.

Key words: apoptosis, hepatoma, natural killer cells, lymphocytes, splenocytes, cytotoxic activity, effector cells.