

## ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И УРОВНЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КРОВИ И В АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЯ

© Ю. В. Шаталин,<sup>1,2</sup> А. А. Наумов,<sup>1</sup> М. М. Поцелуева<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцзино, Московская обл.,*  
<sup>2</sup> *Пуцинский государственный университет;*  
*\* электронный адрес: potselueva@iteb.ru*

На модели трансплантированной асцитной гепатомы Зайделя провели детальное исследование изменений состава клеточной популяции и уровня активных форм кислорода (АФК) в зоне роста опухоли и в плазме крови опухоленосителя. Установлено, что в плазме крови и в зоне роста опухоли складываются различные окислительно-восстановительные условия. Так, в плазме крови из-за гиперактивности лейкоцитов и роста их числа развивается сильный окислительный стресс, сопряженный с поражением здоровых клеток, а с другой стороны, в зоне роста опухоли наблюдается уменьшение концентрации макрофагов, кислорода и уровня АФК. Такие условия способствуют интенсивному росту опухолевых клеток.

**Ключевые слова:** полиморфноядерные лейкоциты, тучные клетки, макрофаги, гистамин, окислительный стресс.

**Принятые сокращения:** АФК — активные формы кислорода, ПМЯЛ — полиморфноядерные лейкоциты, ХЛ — хемилюминесценция, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

Известно, что действию системы естественной резистентности или врожденного иммунитета подвержены бактерии, вирусы, а также поврежденные, мутантные, стареющие и опухолевые клетки. Арсенал средств защиты, используемых организмом, включает в себя как клеточные, так и гуморальные факторы. Так, в первоочередную реакцию на появление опухолевых клеток помимо натуральных киллерных клеток вовлекаются главным образом макрофаги, моноциты и нейтрофилы, обладающие цитотоксической и иммуносупрессорной активностью (Swann, 2007). Имеющиеся в литературе данные и исследования нашей лаборатории позволяют утверждать, что фагоциты (ПМЯЛ и макрофаги), одни из основных компонентов неспецифического иммунитета, вовлечены в защитные механизмы организма, которые активируются при развитии опухоли (Askermann, 1989; Kok et al., 1990; Pustovidko et al., 2000). Эта защита осуществляется преимущественно путем наработки и (или) секреции фагоцитирующими клетками различных соединений — ферментов и химически активных низкомолекулярных соединений, нацеленных на разрушение опухолевых клеток организма. Эти эффекторные клетки осуществляют свою разрушительную функцию благодаря образованию активных форм кислорода (АФК) во внеклеточной среде — в плазме крови, в асците и межтканевом пространстве.

Ранее нами были обнаружены резкие изменения в способности полиморфноядерных лейкоцитов крови (ПМЯЛ) продуцировать АФК в процессе развития трансплантированной опухоли (Поцелуева и др., 2005). На пер-

вой стадии эта способность слегка снижена, а в дальнейшем многократно усиливается. Однако это не ведет к гибели опухолевых клеток. Создаются условия, при которых опухолевая клетка начинает размножаться. В настоящее время вопрос о механизмах взаимоотношения эффекторных и опухолевых клеток на всех фазах опухолевого роста остается открытым. Чтобы приблизиться к решению этого вопроса, необходимо охарактеризовать условия, которые возникают в организме опухоленосителя. В связи с этим были исследованы динамические изменения состава клеточных популяций, их активность и уровень окислительного стресса в зоне роста опухоли и в плазме крови опухоленосителя.

### Материал и методика

В работе использовали  $\beta$ -глюкозу, люминол, фобол-12-миристат-13-ацетат (ФМА), среду RPMI-1640, HEPES, Percoll, TRIS-HCl, фиколл, верографин (Агат-Мед, Россия), гепарин (Спофа, Прага),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , NaCl, краситель Романовского, трипановый синий (ДиаКон, Россия) и дигидрокверцитин (ИБП РАН, Россия).

Объектом исследования служила модель развития асцитной гепатомы Зайделя. Модель развития асцитных опухолей удобна для исследования взаимодействия клеток неспецифического иммунитета и развивающейся опухоли. В экспериментах *in vivo* использовали крыс-самцов линии Вистар массой 200—220 г.

Клетки гепатомы Зайделя (АГЗ) трансплантировали в брюшную полость животного путем введения 1 мл ресуспендированных в солевом буфере клеток в концентрации  $1 \cdot 10^7$  кл./мл. Продолжительность жизни животного с трансплантированной опухолью составляла 12—14 сут.

Выделение клеток и анализ клеточных популяций. Нейтрофилы из циркулирующей крови крыс выделяли по методу Лобашевского (1983) в градиенте плотности фиколл-верографина. Макрофаги и клетки гепатомы Зайделя из асцитической жидкости разделяли на градиенте плотности Percoll-NaCl на границе плотности 1.116 и 1.070 г/мл соответственно. Содержание макрофагов во фракции составляло 90—95 %.

Состав клеточных популяций в крови определяли по мазкам, окрашенным Азуром II—эозином по методу Романовского (Меньшиков, 1987), и на гематологическом анализаторе крови (Coulter A T8, Beckman). Состав клеточной популяции в асцитической жидкости определяли по мазкам, окрашивая препараты по методу Паппенгейма (Семченко и др., 2006) и цитометрическим методом по светорассеиванию (Partec PAS III, Германия). Анализ популяций клеток по размерам, гранулярности и фазам клеточного цикла проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре Partec PAS III (Partec, Германия).

Определение параметров окислительно-го стресса в крови и асцитической жидкости. Уровень АФК в асцитической жидкости определяли методом хемилюминесценции (ХЛ). Для этого в кювету с добавкой люминола (0.125 мкМ) помещали 0.5 мл свежееотобранной асцитической жидкости и регистрировали уровень ХЛ-сигнала в течение 10 мин. Для построения калибровочной кривой к образцу асцитической жидкости (0.5 мл) вносили 100 мкл 4%-ного глутаральдегида с целью ингибирования АФК-генерирующей активности фагоцитов. Через 10 мин к образцу добавляли люминол (250 мкМ) и регистрировали ХЛ-ответ. Для нормирования ответа к асцитической жидкости добавляли раствор  $H_2O_2$  в диапазоне концентраций 1 нМ—1 мкМ. Калибровочные значения использовали для сопоставления с экспериментальными значениями.

Уровень АФК в крови определяли флуоресцентным методом с использованием в качестве зонда AmplexRed. Образец крови объемом 1 мл фиксировали 4%-ным глутаральдегидом, добавляли флуоресцентный зонд в концентрации 10 мкМ, затем инкубировали при 37 °С в течение 1 или 2 ч. Флуоресценцию образцов плазмы крови регистрировали при 570 нм (Mohanty et al., 1997).

## Результаты и обсуждение

Для описания процессов, протекающих в крови и в асцитической жидкости, весь период развития опухоли удобно разделить на 3 фазы: начальную (или первую, 1—4 сут), вторую (5—8 сут) и третью (или терминальную фазу, 9—12 сут). Этими фазами мы и будем оперировать далее.

Изменение состава фракции лейкоцитов в крови опухоленосителя. Развитие опухолевого процесса в организме сопровождается клеточными и гуморальными реакциями неспецифического иммунного ответа. В частности, наблюдается изменение активности, численности и локализации эффекторных клеток. В связи

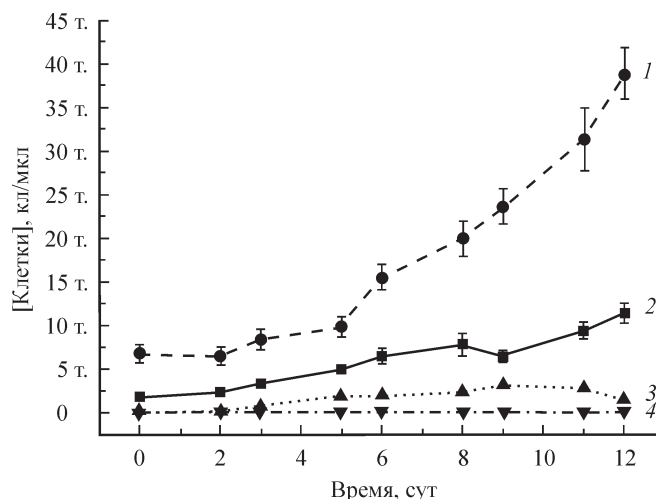


Рис. 1. Изменение концентрации лейкоцитов в крови животного в процессе развития опухоли.

Приведены средние значения и их среднестатистические отклонения, число экспериментов и коэффициент Стьюдента ( $X \pm Sx$ ,  $n = 8$ ,  $P < 0.05$ ). Кривая 1 — изменение концентрации нейтрофилов, кривая 2 — моноцитов, кривая 3 — эозинофилов, кривая 4 — базофилов в плазме.

с этим мы исследовали динамику численности лейкоцитов крови в процессе развития гепатомы Зайделя в организме животного. Как видно на рис. 1, развитие опухоли сопровождается повышением в крови уровня нейтрофилов (в 6—7 раз) и моноцитов (в 4—5 раз), в то время как концентрация базофилов и эозинофилов практически не изменяется. Подобное изменение числа лейкоцитов в крови говорит об усилении иммунной реакции в процессе развития опухоли, что согласуется с данными, полученными рядом авторов при исследовании других видов опухолей (Поцелуева и др., 1999). В настоящее время причины, приводящие к увеличению числа ПМЯЛ у животных-опухоленосителей, неясны. Можно полагать, что такой причиной может быть увеличение уровня гематопоэтического фактора роста G-CSF или GM-CSF, поскольку показана корреляция числа лейкоцитов и уровня G-CSF в циркулирующей крови (Chen et al., 2000). Следует отметить, что гематопоэтические факторы роста могут не

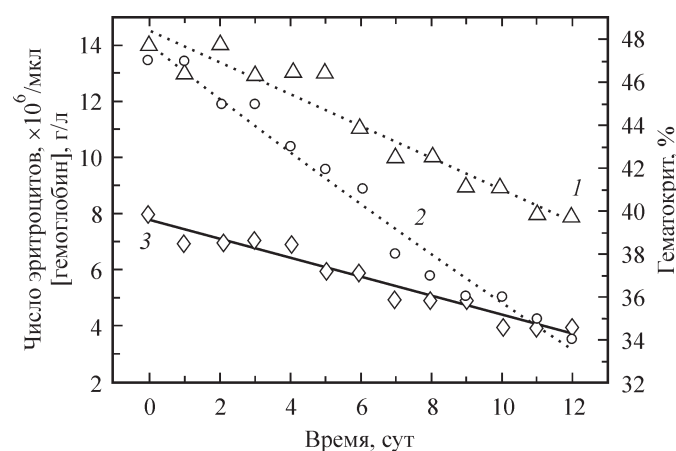


Рис. 2. Изменение концентрации эритроцитов, гемоглобина и величины гематокрита в крови в процессе развития опухоли.

Кривая 1 — изменение содержания гемоглобина в эритроцитах, кривая 2 — гематокрит, %, кривая 3 — изменение числа эритроцитов.

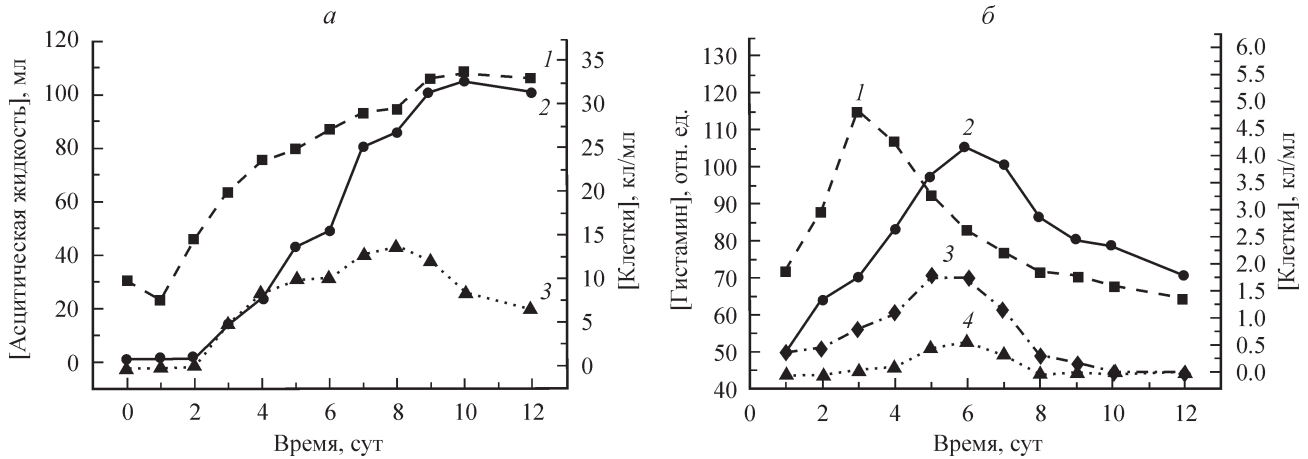


Рис. 3. Изменение объема асцитической жидкости, числа разных клеток и продуцируемого гистамина в зоне роста опухоли в организме опухоленосителя.

*a* — динамика роста опухолевых клеток (1), объема асцитической жидкости (2) и изменения числа лимфоцитов (3); *б* — изменение концентрации макрофагов (1), динамика концентрации гистамина (2), тучных клеток (3) и концентрации дегранулирующих тучных клеток (4).

только увеличивать число ПМЯЛ, но и оказывать прямое влияние на функции лейкоцитов путем праймирования их АФК-генерирующей активности. Нами также обнаружено (рис. 2) снижение концентрации эритроцитов в крови, концентрации в них гемоглобина и снижение величины гематокрита в процессе роста опухоли. Развитие анемии в процессе роста опухоли наблюдается также при некоторых опухолевых заболеваниях человека и после лучевой терапии (Бредер и др., 2002).

Изменение состава клеточных популяций асцитической жидкости в ходе роста опухоли в брюшной полости животного. В литературе описано усиление миграции макрофагов (Knowles, Harris, 2007), лимфоцитов (Yamaki et al., 1990) и тучных клеток (Ch'ng, 2006) в зону роста солидных опухолей. Однако мы не обнаружили в литературе исследо-

ваний, посвященных изучению динамических изменений численности клеточных популяций в асците. Оценка соотношения между эффекторными и опухолевыми клетками в асците необходима для выявления интенсивности иммунной реакции на рост опухоли в организме.

Динамика изменения концентрации опухолевых клеток в асците (рис. 3, *a*) имеет обычный вид кривой с насыщением и с максимальной скоростью роста во второй фазе развития опухоли. Процесс возрастания числа опухолевых клеток сопровождается увеличением объема асцитической жидкости, который может достигать 100—110 мл. Макрофаги и тучные клетки мигрируют в зону роста опухоли из близлежащих тканей. Накопление макрофагов в асците (рис. 3, *б*) начинается практически одновременно с увеличением количества опухолевых клеток, достигая максимума в первой фазе развития опу-

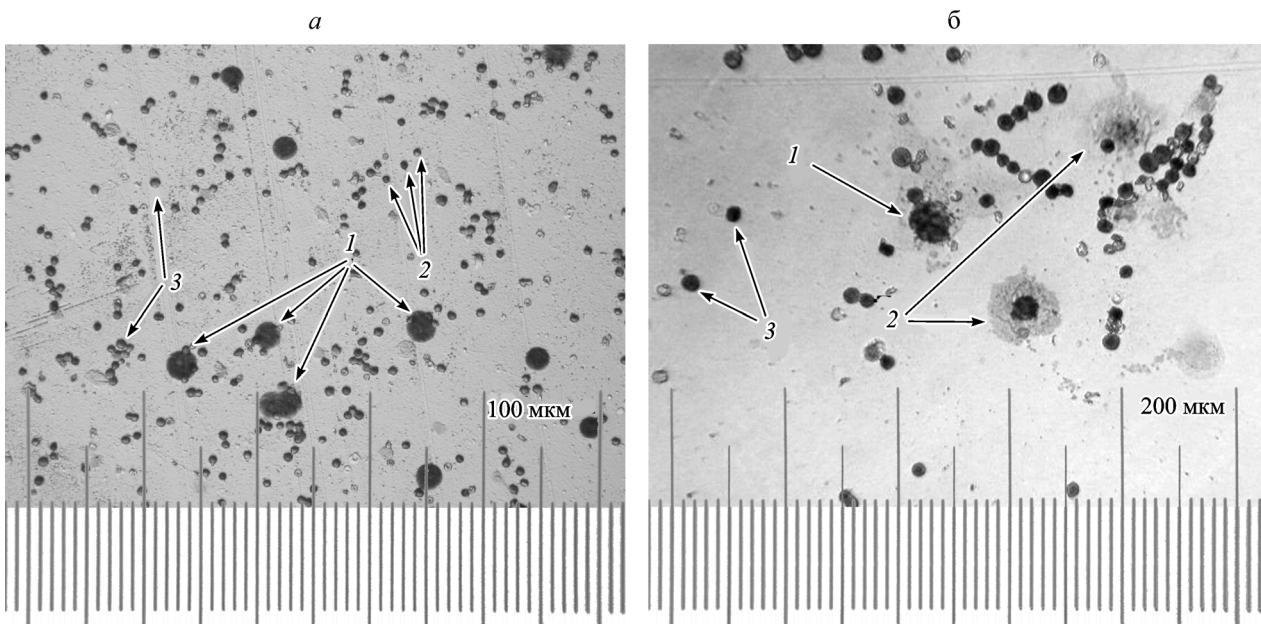


Рис. 4. Фиксированный препарат асцитической жидкости (*a*), окрашенный по Папенгему.

*a*: 1 — тучные клетки, 2 — лимфоциты, 3 — опухолевые клетки; *б* — процесс дегрануляции популяции тучных клеток с максимумом на 5—7-е сут: 1 — тучные клетки, 2 — процесс дегрануляции тучных клеток, 3 — опухолевые клетки.

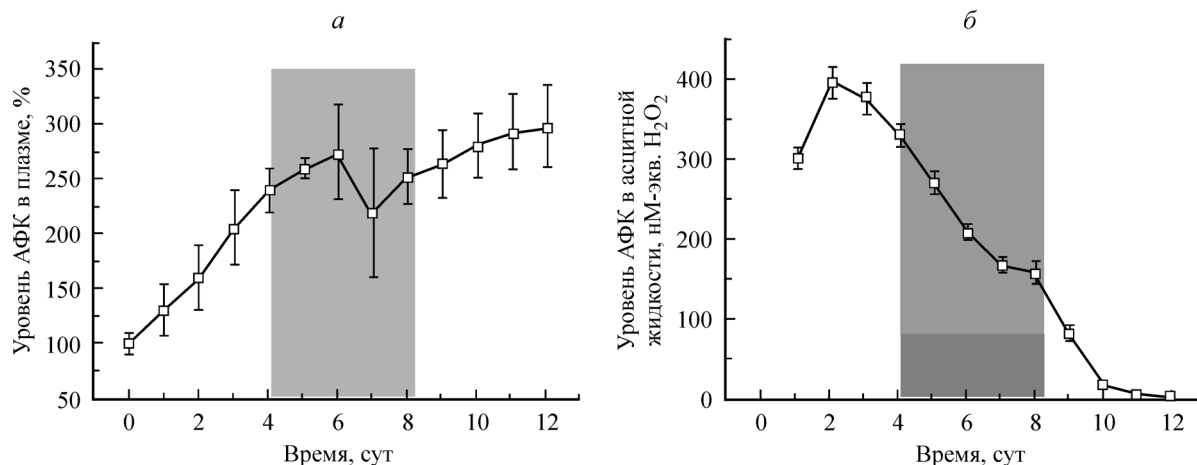


Рис. 5. Изменение уровня активных форм кислорода в плазме крови (а) и асците (б) в процессе развития опухоли в брюшной полости животного.

Приведены средние значения и их среднестатистические отклонения, число экспериментов и коэффициент Стьюдента ( $X \pm Sx$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.05$ ).

холи (~500 тыс. кл./мл), а затем монотонно снижается. Концентрация тучных клеток в асците возрастает, достигая максимального значения (~100 тыс. кл./мл) к середине второй фазы. Этот период характеризуется падением концентрации макрофагов и сильным ростом объема асцита. С ростом концентрации тучных клеток (рис. 3, б) увеличивается степень их дегрануляции, что наглядно представлено на рис. 4. Дегрануляция тучных клеток (рис. 4, б) ведет к возрастанию концентрации гистамина в зоне роста опухоли. Гистамин — это медиатор, способствующий росту капилляров и увеличению их проницаемости, что ведет в свою очередь к увеличению объема асцита.

Таким образом, ПМЯЛ, к которым относится популяция клеток, циркулирующих в кровеносном русле, состоящая в основном из нейтрофилов и моноцитов, а также мононуклеарные лейкоциты (макрофаги) участвуют как в репаративно-восстановительных реакциях, так и в реакциях организма на рост опухоли. Однако эти клетки нужны не только в качестве продуцентов цитотоксичных свободных радикалов и протеолитических ферментов, но и опухолевым клеткам, которым для полноценного роста необходим постоянный приток миеломоноцитов для поддержания ангиогенеза, трансформации стромы и для подавления противоопухолевых реакций. Эти закономерности были установлены при исследовании выделенных из опухоли факторов, которые активировали миелопоэз (Deparain et al., 2003), миграцию в зону роста опухоли (Hiratsuka et al., 2006) и функциональное дифференцирование миеломоноцитов (Iwamoto et al., 2007). Как показали исследования, основная масса клеток этого типа была представлена макрофагами (Billiau et al., 2005). Одним из важных следствий миграции в зону роста опухоли и функционального дифференцирования этих клеток является то, что они могут вызывать нарушение работы лимфоцитов (Sica, Bronte, 2007).

Исследование уровня активных форм кислорода в плазме крови и асцитической жидкости. При нормальном функционировании системы врожденного иммунитета трансформированные клетки не имеют перспективы выжить благодаря образованию различных АФК (гидроксильного радикала, супероксидного аниона, пероксида водорода) и действию лизосо-

мальных ферментов. Нарушения в продукции и дезактивации АФК сопровождаются накоплением окислительных повреждений и развитием различных патологических состояний. Уровень АФК является результатом как минимум двух разнонаправленных процессов, а именно наработки АФК фагоцитами и деградации этих соединений антиоксидантами плазмы крови и асцита.

На рис. 5, а показано, что к середине 2-й фазы уровень АФК в плазме повышается более чем в 2.5 раза. Этот результат согласуется с увеличением удельной АФК-генерирующей активности ПМЯЛ крови в 4—5 раз (Поцелуева и др., 1999) и с увеличением концентрации лейкоцитов в 6—7 раз. В зоне асцитической жидкости наблюдается иная картина: обнаружено возрастание уровня АФК до максимальных значений (до 400 нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в первой фазе роста опухоли с последующим экспоненциальным снижением до значений, эквивалентных 3—5 нМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 5, б). Динамика снижения уровня АФК совпадает с падением АФК-генерирующей активности макрофагов (Поцелуева и др., 1999) и с ростом гипоксии в зоне опухоли (данные не представлены). Резюмируя вышесказанное, можно утверждать, что в плазме крови и в зоне роста опухоли складываются различные окислительно-восстановительные условия. Так, в плазме крови из-за гиперактивности ПМЯЛ развивается сильный окислительный стресс, который сопряжен с поражением здоровых клеток (Поцелуева и др., 2005), в том числе самих фагоцитов, с одной стороны, а с другой — в зоне роста опухоли наблюдается уменьшение концентрации макрофагов, кислорода и уровня АФК, которые способствуют росту опухолевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Рособразования согласно тематическому плану ЕЗН № 1.4.08 и программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (№ 6663).

#### Список литературы

Бредер В. В., Горбунов В. А., Бесова Н. С. 2002. Анемия при злокачественных опухолях. Современная онкология. 4(3) : 134—136.

- Лобашевский А. Л. 1983. Выделение полиморфноядерных лейкоцитов из малых объемов крови после осаждения декстраном. Лаб. дело. 1 : 28—31.
- Меньшиков В. В. (Ред.). 1987. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. М.: Медицина. 238 с.
- Поцелуева М. М., Пустовидко А. В., Алабин В. С., Евтодченко Ю. В. 1999. Генерация реактивных форм кислорода полиморфноядерными лейкоцитами в процессе развития гепатомы в брюшной полости животных. Цитология. 41(2) : 162—166.
- Поцелуева М. М., Пустовидко А. В., Шаталин Ю. В., Евтодченко Ю. В. 2005. Цитотоксическое действие полиморфноядерных лейкоцитов на опухолевые и нормальные клетки *in vitro* и *in vivo*. Цитология. 47 (1) : 1032—1038.
- Семченко В. В., Баращикова С. А., Ноздрин В. И., Артемьев В. Н. 2006. Гистологическая техника. Омск—Орел; Омская мед. академия. 206 с.
- Ackermann M. F., Lamm K. R., Wiengand G. W., Lister M. I. 1989. Antitumor activity of murine neutrophils demonstrated by cytometric analysis. Cancer research. 49 : 528—532.
- Billiau A. D., Roskams T., Van Damme-Lombaerts R., Mathys P., Wouters C. 2005. Macrophage activation syndrome: characteristic findings on liver biopsy illustrating the key role of activated, IFN-gamma-producing lymphocytes and IL-6- and TNF-alpha-producing macrophages. Blood. 105 (4) : 1648—1651.
- Chen R. L., Reynolds C. P., Seeger R. S. 2000. Neutrophil are cytotoxic and growth-inhibiting for neuroblastoma cells with and anti-GD2 antibody but, without cytotoxicity, can be growth-stimulating. Cancer Immunol. Immunother. 48 (1) : 603—612.
- Ch'ng S., Wallis R. A., Yuan L., Davis P. F., Tan S. T. 2006. Mast cells and cutaneous malignancies. Mod. Pathol. Jan. 19 (1) : 149—159.
- Deonarain R., Verma A., Porter A. C., Gewert D. R., Plataniias L. C., Fish E. N. 2003. Critical roles for IFN-beta in lymphoid development, myelopoiesis, and tumor development: links to tumor necrosis factor alpha. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100(23) : 13 453—13 458
- Hiratsuka S., Watanabe A., Aburatani H., Maru Y. 2006. Tumor-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. Nat. Cell Biol. 8(12) : 1369—1375.
- Iwamoto S., Iwai S., Tsujiyama K., Kurahashi C., Takeshita K., Naoe M., Masunaga A., Ogawa Y., Oguchi K., Miyazaki A. 2007. TNF-alpha drives human CD14+ monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. J. Immunol. 179(3) : 1449—1457.
- Knoles H. J., Harris A. L. 2007. Macrophages and the hypoxic tumor microenvironment. Front Biosci. 1 (12) : 4298—4314.
- Kok P. M., van Kessel A., Verhoef J. 1990. A view to a kill: cytotoxic mechanisms of human polymorphonuclear leukocytes compared with monocytes and natural killer cells. Pathobiology. 58 : 249—264.
- Mohanty J. G., Jaffe J. S., Schulman E. S., Raible D. G. 1997. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. J. Immunol. Methods. 202 : 133—141.
- Pustovidko A., Potselueva M., Evtodienko Yu. 2000. Generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and its modulation by calcium ions during tumor growth. IUBMB Life. 50 : 69—73.
- Sica A., Bronte V. 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. J. Clin. Invest. 117 : 1155—1166.
- Swann J. B., Smyth M. J. 2007. Immune surveillance of tumors. J. Clin. Invest. 117 : 1137—1146.
- Yamaki T., Uede T., Kikuchi K. 1990. Cellular mechanisms of tumor rejection in rats. Nat. Immun. Cell Growth Regul. 9 (1) : 1—25.

Поступила 6 X 2009

#### VARIATIONS IN CELL POPULATION SIZE AND REACTIVE OXYGEN SPECIES LEVEL IN THE BLOOD AND THE ASCITES LIQUID OF TUMOR CARRIER

Yu. V. Shatalin,<sup>1,2</sup> A. A. Naumov,<sup>1</sup> M. M. Potselueva<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushechino, Moscow and <sup>2</sup> Pushechino, Moscow Region,  
\* e-mail: potselueva@itebru

Using Seidel ascites hepatoma as a model, we studied in detail changes in cell population size and in the level of reactive oxygen species in the tumor growth zone and in the blood plasma of tumor carrier. It was found that reduction-oxidation conditions in the blood plasma and in the tumor growth zone were different. Thus, because of hyperactivity and increase in the number of leukocytes, the blood plasma exhibited strong oxidative stress inducing damage to healthy cells, whereas the tumor growth zone showed the decrease in macrophage concentration, as well as in oxygen and ROS levels. These conditions favor intensive growth of tumor cells.

Key words: polymorphonuclear leukocytes, mast cells, macrophages, histamine, oxidative stress.