

Ю.П. Бельский, М.Г. Данилец, Н.В. Бельская, В.К. Патрушев,
Е.С. Трофимова, В.И. Агафонов

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ИММУНОСУПРЕССОРНОЙ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЯХ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ

ГУ НИИ фармакологии Томского научного центра СО РАМН, Томск

Работа посвящена сравнительному исследованию роли оксида азота в иммуносупрессорной и противоопухолевой активностях клеток печени эмбрионов мышей, полученных на 14-е и 19-е сутки внутриутробного развития. Показано, что неприлипающие к пластику клетки печени эмбрионов подавляли пролиферацию как сингенных Т-лимфоцитов, активированных митогеном, так и опухолевых клеток мастоцитомы Р-815. В присутствии блокатора NO-синтазы L-NMMA иммуносупрессорная активность отменялась полностью, противоопухолевая не изменялась. Клетки с иммуносупрессорными свойствами, так же, как и клетки-продуценты оксида азота, обладали низкой плавучей плотностью. Таким образом, клетки эмбриональной печени обладают NO-зависимой иммуносупрессорной и NO-независимой противоопухолевой активностями. Суммируя вышесказанное и учитывая данные других авторов, можно заключить, что естественная супрессорная активность является общим свойством гемопоэтических тканей.

Ключевые слова: иммунорегуляция, оксид азота, эмбриональная печень

Иммунорегуляторные свойства гемопоэтических клеток разной степени зрелости и принадлежащих к разным росткам изучаются последние 20 лет [3, 4, 6, 8, 9, 12, 13]. Способность таких клеток подавлять реакции Т- и В-лимфоцитов в ответ на антигены и митогены *in vitro* и *in vivo* без предварительного контакта с мишенями и рестрикции по антигенам комплекса гистосовместимости путем выделения супрессорных факторов обозначена в литературе термином «естественная супрессорная активность». Позже была описана и противоопухолевая активность естественных супрессорных клеток как способность подавлять пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* [11, 13]. Показано, что в качестве факторов иммуносупрессорной активности могут выступать трансформирующий фактор роста бета, оксид азота (NO), простагландины, эритроидный супрессорный фактор небелковой природы и др. [5, 9, 10, 14]. Противоопухолевая активность и ее факторы изучены мало, только в работах [2, 11] показано, что NO в ней не играет роли.

В качестве источника естественных супрессорных клеток в приведенных работах были использованы костный мозг и селезенки взрослых мышей, а также селезенки новорожденных [8]. Печень эмбриона как источник иммуносупрессорных клеток исследовали мало. Показано, что ее клетки обладают противоопухолевой активностью [1], а выделенные из печени эритроидные незрелые клетки

подавляют функции В-лимфоцитов и не влияют на Т-клетки [4]. Целью настоящей работы явилось изучение влияния клеток эмбриональной печени на пролиферацию Т-лимфоцитов, а также роли оксида азота в механизме их иммуносупрессорной и противоопухолевой активностей.

Методика. В работе использовано 24 мыши линии C57Bl/6 и DBA/2 в возрасте 10-16 недель, полученных из коллекционного фонда НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН. Животные соответствовали 1 категории (согласно сертификату), содержались в неполной барьерной системе, имели постоянный доступ к воде и пище, получали стерилизованный гранулированный корм и кипяченую питьевую воду, подкисленную соляной кислотой (рН=4-4,5). Клеточную линию Р-815 (мастоцитома) поддерживали в асцитной форме на мышях линии DBA/2. Клетки печени получали от эмбрионов известного возраста, для чего беременных самок (14-е и 19-е сутки гестации) забивали под легким ингаляционным наркозом декапитацией, вскрывали брюшную полость, переносили из матки эмбрионы в чашки Петри с изотоническим раствором хлорида натрия (ФР), декапитировали, гомогенизировали их печень, фильтровали через 4-слойный капрон. Опухолевые клетки выделяли из асцитной жидкости. Спленициты получали из селезенки не беременных самок. Клетки трижды промывали ФР и ресуспендировали в культураль-

ной среде. Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с 0,1% трипановым синим. В экспериментах использовали суспензии, содержащие не менее 95% жизнеспособных клеток. Клетки культивировали в атмосфере с 5% CO₂ и абсолютной влажности в среде следующего состава: RPMI 1640 (Sigma) с добавлением 10% ЭТС (ICN, Serva), 20 мМ HEPES, 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола (оба Sigma), 50 мкг/мл гентамицина и 2 мМ L-глутамина (оба Flow Lab). Из суспензии клеток эмбриональной печени удаляли прилипающие к пластику клетки культивированием 1 ч в пластиковых чашках Петри («Costar») в концентрации 3-5×10⁶/мл. Затем неприлипающие клетки собирали, отмывали и ресуспендировали в среде.

Фракционирование клеток по плавучей плотности проводили с использованием коммерческого раствора для сепарации клеток (Flow Lab, ρ=1,077 г/мл). Суспензию клеток осторожно настилали на жидкость для сепарации, после 15-минутного центрифугирования при 400 g клетки, сформировавшие кольцо в растворе, собирали, трижды отмывали холодным ФР, ресуспендировали в культуральной среде и оценивали их жизнеспособность.

Оценку иммуносупрессорной и противоопухолевой активностей проводили по способности подавлять пролиферацию клеток-мишеней (сингенных лимфоцитов селезенки, активированных митогеном) или опухолевых клеток Р-815 [5, 13]. Для этого неприлипающие клетки-эффекторы культивировали в 96-луночных планшетах совме-

стно со спленоцитами (2×10⁵ на лунку 60-64 ч в присутствии конканавалина А (Sigma), 4 мкг/мл) или клетками мастоцитомы (2×10⁴ на лунку 36-40 ч). За 16 ч до окончания культивирования вносили по 0,5 мкКю/лунку ³Н-тимидина. Затем содержимое лунок переносили на стекловолокнистые фильтры и оценивали включение изотопа. Пролиферативную активность клеток выражали в количестве импульсов в минуту либо в виде индекса супрессии (%), который вычисляли по следующей формуле: ИС=(1-О/К)×100, где О — количество имп./мин в лунках (эффекторы + мишени), К — количество имп./мин в лунках с клетками-мишенями.

Продукцию оксида азота (NO) оценивали по содержанию нитритов в супернатантах при помощи реактива Грейса [7]. Реактив (0,1 мл) смешивали с эквивалентным объемом супернатанта и измеряли абсорбцию при длине волны 550 нм. Концентрацию нитритов определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов нитрита натрия. В части экспериментов в лунки вносили 2 мМ блокатора NO-синтазы — NG-монометил-L-аргинина (NMMA, Sigma).

Статистическую обработку проводили при помощи t-критерия Стьюдента. Различия показателей считали достоверными при p<0,05.

Результаты. Было обнаружено, что клетки печени эмбрионов мыши на 14-й день внутриутробного развития обладали иммуносупрессорной активностью и способностью продуцировать оксид азота (таблица 1). Для определения участия NO в

Таблица 1

**Роль оксида азота в иммуносупрессорной и противоопухолевой активностях клеток печени
14-дневных эмбрионов мышей линии C57Bl/6 (X±m)**

Количество клеток в лунке (тыс.)		Без NMMA		+ NMMA	
Эффекторы	Мишени	Пролиферация клеток (имп./мин.)	Концентрация нитритов (мкМ)	Пролиферация клеток (имп./мин.)	Концентрация нитритов (мкМ)
Иммуносупрессорная активность					
0	200	25416±1239	<2	24377±2118	<2
200	0	2256±1165	<2	2593±233	<2
400	0	3473±566	<2	3661±985	<2
200	200	16774±1576* (34,0)	26,7±3,1	23840±1915# (2,2)	3,0±1,6#
400	200	11615±1330* (54,3)	37,0±5,3	22722±1169# (6,8)	6,5±0,8#
Противоопухолевая активность					
0	20	22640±1080	<2	24377±2105	<2
200	20	2752±863	<2	2936±1546	<2
400	20	4135±898	<2	4262±975	<2
200	20	9765±2196* (56,9)	<2	9457±1453* (61,2)	<2
400	20	3269±1391* (85,6)	<2	3948±1533* (83,8)	<2

Примечание: в скобках указан индекс супрессии; * — различие достоверно (p<0,05) при сравнении с соответствующим показателем мишеней в отсутствие эффекторов; # — различие достоверно (p<0,05) при сравнении с аналогичным показателем в отсутствие NMMA.

качестве фактора иммуносупрессорной активности клеток эмбриональной печени сравнили уровень этой активности в присутствии и в отсутствие блокатора NO-синтазы (NMMA). Иммуносупрессорная активность в присутствии NMMA снижалась: при соотношении эффектор/мишень 1/1 с 34,0% до 2,2%, при соотношении 2/1 с 54,3% до 6,8%. При этом уменьшалась и концентрация нитритов с 26,7 мкМ до 3,0 мкМ и с 37,0 мкМ до 6,5 мкМ (соответственно в меньшем и большем соотношениях). Следует отметить, что в присутствии NMMA пролиферация клеток-мишеней, культивировавшихся отдельно от эффекторов, не изменялась. Клетки печени тех же эмбрионов проявляли противоопухолевую активность. Ее уровень не зависел от присутствия NMMA и составлял в соотношении эффектор/мишень 10/1 56,9 и 61,2% в отсутствие или при добавлении блокатора; в соотношении 20/1 — 85,6 и 83,8% соответственно. При этом оксид азота ни в одном из вариантов культур не выявлялся.

В более поздние сроки внутриутробного развития (19-й день) клетки эмбриональной печени сохраняли иммуносупрессорную и противоопухолевую активности (таблица 2). Подавление синтеза оксида азота привело к значительному снижению иммуносупрессорной активности клеток эмбриональной печени: в соотношении эффектор/мишень 1/1 с 61,5 до 18,9%, в большем соотношении (2/1) с 78,1 до 22,2%. Одновременно со снижением иммуносупрессорной активности наблюдали и уменьшение концентрации нитритов — с 33,0 мкМ

до 6,1 мкМ в соотношении 1/1 и с 58,8 мкМ до 10,1 мкМ в соотношении 2/1. Исследование роли NO в противоопухолевой активности клеток печени 19-дневного эмбриона мыши показало, что блокирование NO-синтазы не оказывало никакого влияния на ее уровень. Эмбриональные клетки подавляли пролиферацию опухолевых клеток-мишеней как в присутствии NMMA (на 50,7 и 72,1% в меньшем и большем соотношениях соответственно), так и в культуре, не содержащей блокатор (на 45,3 и 68,3% в меньшем и большем соотношениях соответственно). При этом нитриты не были обнаружены.

Клетки костного мозга, проявляющие иммуносупрессорную активность, при разделении по плавучей плотности обнаруживаются во фракции с плотностью менее 1,075 г/мл [5, 13]. При фракционировании клеток эмбриональной печени было получено (таблица 3), что клетки с плавучей плотностью более 1,077 г/мл (высокоплотностная фракция) не проявляли иммуносупрессорной активности и не продуцировали оксид азота при соотношении эффектор/мишень 1/1, 2/1 и даже 4/1. Неприлипающие клетки печени подавляли пролиферацию лимфоцитов-мишеней на 32,5% и проявляли NO-синтезирующую активность только в соотношении 2/1, концентрация нитритов при этом составила 7,2 мкМ, в то время как клетки низкоплотностной фракции — в обоих соотношениях (на 23,2 и на 46,2% в меньшем и большем соответственно). Концентрация нитритов повышалась параллельно с увеличением иммуносу-

Таблица 2

**Роль оксида азота в иммуносупрессорной и противоопухолевой активностях
клеток печени 19-дневных эмбрионов мышей линии C57Bl/6 ($X \pm m$)**

Количество клеток в лунке (тыс.)		Без NMMA		+ NMMA	
Эффекторы	Мишени	Пролиферация клеток (имп/мин)	Концентрация нитритов (мкМ)	Пролиферация клеток (имп/мин)	Концентрация нитритов (мкМ)
Иммуносупрессорная активность					
0	200	29040±3247	<2	32331±1969	<2
200	0	1863±286	<2	1742±522	<2
400	0	2976±971	<2	3162±1285	<2
200	200	11180±2348* (61,5)	33,0±5,1	26223±2307# (18,9)	6,1±1,8#
400	200	6360±1581* (78,1)	58,8±4,5	25149±3655# (22,2)	10,1±2,1
Противоопухолевая активность					
0	20	31455±1380	<2	33450±2748	<2
200	0	2180±1180	<2	1860±966	<2
400	0	2974±264	<2	2586±690	<2
200	20	17193±1400* (45,3)	<2	16498±1817* (50,7)	<2
400	20	9962±876* (68,3)	<2	9348±1012* (72,1)	<2

Примечание: в скобках указан индекс супрессии; * — различие достоверно ($p < 0,05$) при сравнении с соответствующим показателем мишеней в отсутствие эффекторов; # — различие достоверно ($p < 0,05$) при сравнении с аналогичным показателем в отсутствие NMMA.

Таблица 3

**Иммуносупрессорная активность и продукция оксида азота фракциями неприлипающих клеток печени
14-дневных эмбрионов мышей линии C57Bl/6, различающихся по плавучей плотности ($X \pm m$)**

Количество клеток в лунке (тыс.)		Неприлипающие (контроль)		Низкоплотностные		Высокоплотностные	
Эффекторы	Мишени	пролиферация клеток (имп/мин)	концентрация нитритов (мкМ)	пролиферация клеток (имп/мин)	концентрация нитритов (мкМ)	пролиферация клеток (имп/мин)	концентрация нитритов (мкМ)
0	200	47728±3432	<2	47728±3432	<2	47728±3432	<2
200	0	1730±527	<2	2230±290	<2	1767±256	<2
400	0	2510±580	<2	3503±144	<2	2317±196	<2
800	0	—	—	—	—	3180±387	<2
200	200	47197±1829 (1,1)	<2	36673±1924*# (23,2)	10,9±1,0	46853±1936 (1,8)	<2
400	200	32237±1996* (32,5)	7,2±0,8	25667±871*# (46,2)	23,1±0,8#	47210±2053# (1,1)	<2
800	200	—	—	—	—	48283±1571 (-1,2)	<2

Примечания: в скобках указан индекс супрессии; * — различие достоверно ($p < 0,05$) при сравнении с соответствующим показателем мишеней в отсутствие эффекторов; # — различие достоверно ($p < 0,05$) при сравнении с аналогичным показателем в присутствии контрольных эффекторов.

рессии с 10,9 мкМ (в соотношении 1/1) до 23,1 мкМ (в соотношении 2/1).

Закключение

Как показали проведенные исследования, клетки печени эмбрионов, полученные на 14-е и 19-е сутки внутриутробного развития, проявляли способность подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов и опухолевых клеток. Оксид азота выступал в роли главного супрессорного фактора только против лимфоцитов и не участвовал в подавлении пролиферации опухолевых клеток. Клетки эмбриональной печени с иммуносупрессорными свойствами, так же, как и клетки-продуценты оксида азота, обладали низкой плавучей плотностью.

Таким образом, клетки эмбриональной печени, как и костного мозга, обладают NO-зависимой иммуносупрессорной и NO-независимой противоопухолевой активностями. Суммируя вышесказанное и учитывая данные других авторов, можно заключить, что естественная супрессорная активность является общим свойством гемопоэтических тканей.

The role of nitric oxide in immunosuppressor and anti-tumor activities of embryonic hepar-derived cells

Y.P. Belsky, M.G. Danilets, N.V. Belskaya, V.K. Patrushev, E.S. Trofimova, V.I. Agaphonov

The article is devoted to comparative study a role of nitric oxide in immunosuppressor and anti-tumor activities of hepar-derived cells taken from murine embryos after 14- and 19-days of it embryonic growth. It has been shown here, non-adherent hepar-derived cells have suppressed a proliferation of syngenic mitogen-activated T lymphocytes and mastocytoma P-815 cells. The addition of a competitive iNOS inhibitor L-NMMA completely abrogated the immunosuppres-

sor activity, but not effect on the anti-tumor ones. Thus, embryonic hepar-derived cells are possessed of the NO-dependent immunosuppressor and NO-independent anti-tumor activities. Taken together our findings and others, it may be concluded that natural suppressor activity is a general property of all haemopoietic tissues.

Литература

1. Бельский Ю.П., Кусмарцев С.А. // Экспериментальная и клиническая иммунология. — Томск, 1995. — С. 25-31.
2. Бельский Ю.П., Бельская Н.В., Данилец М.Г. и др. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1999. — Т. 127. — № 4. — С. 452-454.
3. Кусмарцев С.А., Бельский Ю.П., Агранович И.М., Землянская Н.В. // Успехи соврем. биологии. — 1994. — Т. 114. — № 6. — С. 705-714.
4. Цырлова И.Г., Чеглякова В.В., Козлов В.А. // Онтогенез. — 1985. — № 2. — С. 143-148.
5. Angulo I., Rodriguez R., Garcia B. et al. // J. Immunol. — 1995. — Vol. 155. — P. 15-26.
6. Brooks-Kaiser J.C., Hoskin D.W. // J. Reproductive Immunol. — 1993. — Vol. 25. — Is. 1. — P. 31-49.
7. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al. // Anal. Biochem. — 1982. — Vol. 126. — P. 131-143.
8. Maier T., Holda J.H., Claman H.N. // J. Immunol. — 1989. — Vol. 143. — № 2. — P. 491-498.
9. McGarry R.C., Singhal S.K. // Immunol. — 1982. — Vol. 46. — № 2. — P. 387-394.
10. Moore S.C., Shaw M.A., Soderberg L.S.F. // J. Leuk. Biol. — 1992. — Vol. 52. — P. 596-601.
11. Seledtsov V.I., Avdeev I.V., Morenkov A.V. // Immunobiol. — 1995. — Vol. 192. — P. 205-217.
12. Strober S. // Annu. Rev. Immunol. — 1984. — Vol. 2. — P. 219-237.
13. Sugiura K., Inaba M., Ogata H. et al. // Cancer Res. — 1990. — Vol. 50. — P. 2582-2586.
14. Young M.R., Wright M.A., Coogan M. et al. // Cancer Immunol. Immunother. — 1992. — Vol. 35. — P. 14-18.