

SIGNIFICANCE OF EXPRESSION OF CD54, CD25, PROLIFERATING CELL ANTIGENS, AND IgM IN TUMOR CELLS AND LYMPHOCYTES FOR THEIR INTERACTIONS *IN VITRO*

N.M. Berezhnaya, S.I. Spivak, Yu.D. Vinnichuk, E.V. Kovalchuk, V.F. Konovalenko
R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv 03022, Ukraine*

ЭКСПРЕССИЯ CD54, CD25, АНТИГЕНА ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КЛЕТОК И IgM В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ И ЛИМФОЦИТАХ ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ *IN VITRO*

Н.М. Березная, С.И. Спивак, Ю.Д. Винничук, Е.В. Ковальчук, В.Ф. Коноваленко
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. П.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина*

The role of the expression of proliferating cell antigen, CD54, CD25, and IgM in the interaction of lymphocytes of distant and regional lymph nodes with tumor cells was studied upon analysis of MH-rabdomyosarcoma growth and methylcholanthrene-induced tumorigenesis. Antitumor activity of regional lymph node lymphocytes was higher than antitumor activity of distant lymph node lymphocytes. Such an activity was more pronounced in case of transplantable MH-rabdomyosarcoma. This antitumor activity correlated with expression of CD54 and IgM on lymphocytes of mice with MH-rabdomyosarcoma and with proliferating cell antigen expression on lymphocytes of mice with methylcholanthrene-induced tumors.

Key Words: rabdomyosarcoma, lymphocytes, interaction, adhesion, proliferation.

На двух моделях опухолевого роста — перевивной МХ-рабдомиосаркоме и бластоогенезе, индуцированном метилхолантреном у мышей линии BALB/c, изучали взаимодействие лимфоцитов регионарных и отдаленных лимфатических узлов с опухолевыми клетками и влияние на этот процесс экспрессии антигена CD54, CD25, IgM и антигена пролиферирующих клеток. Установлено, что противоопухолевое действие лимфоцитов регионарных лимфатических узлов выше, чем лимфоцитов отдаленных лимфатических узлов. Противоопухолевое действие лимфоцитов было более выражено при перевивной МХ-рабдомиосаркоме, чем при бластоогенезе, индуцированном метилхолантреном. Противоопухолевое действие ассоциируется с экспрессией CD54, IgM на лимфоцитах при перевивной МХ-рабдомиосаркоме и антигена пролиферирующих клеток на лимфоцитах при бластоогенезе, индуцированном метилхолантреном.

Ключевые слова: рабдомиосаркома, лимфоциты, адгезия, пролиферация.

Взаимодействие опухолевых клеток и лимфоцитов обусловлено как особенностями опухолевых клеток, так и функциональной активностью клеток иммунной системы [1–3]. В последнее время появились данные о том, что характер подобного взаимодействия во многом зависит от экспрессии клетками различных поверхностных рецепторов, в частности, рецепторов к интерлейкинам [1, 4, 5], молекул адгезии — CD11/CD18, CD58, CD54, CD102, CD44, экспрессия которых связана с активацией различных клеток иммунной системы [6–12] и участием в трансэндотелиальной миграции лимфоцитов [13]. Во взаимодействии опухолевых клеток и лимфоцитов непосредственное участие принимают также антигены CD40 и CD154, ко-стимулирующие молекулы CD80, CD86 и др. [14–16], различные антигены главного комплекса гистосовместимости [17, 18].

Вызывает интерес и тот факт, что различные субпопуляции Т- и В-лимфоцитов, которые могут быть причастны к формированию противоопухолевого ответа, способны нести на своей поверхности различные иммуноглобулины и иммуноглобулин-подобные молекулы. Отмечено, что МКАТ против определенных иммуноглобулинов распознавали опухолевые клетки, находящиеся в стадии стабильного роста или регрессии [18].

Однако многое в вопросе взаимодействия опухолевых клеток и лимфоцитов остается неясным. Это в первую очередь относится к выяснению роли других поверхностных рецепторов и внутриклеточных молекул в указанном взаимодействии. Практически отсутствует информация об экспрессии тех или иных поверхностных рецепторов в динамике роста опухоли с учетом особенностей модели опухолевого процесса. Целью работы было изучение взаимодействия опухолевых клеток и лимфоцитов регионарных и отдаленных лимфатических узлов мышей с перевивной МХ-рабдомиосаркомой и опухолью, индуцированной МХ, и выяснение значения для этого взаимодействия экспрессии отдельных поверхностных рецепторов.

Received: June 25, 2000.

*Correspondence. Fax: (380-44) 267-1656

Используемые сокращения: АПК — антиген пролиферирующих клеток; ИЛ-2 — интерлейкин-2; МКАТ — моноклональные антитела; МХ — метилхолантрен.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Опыты проведены на 2 группах мышей–самцов (масса тела 15–20 г) линии BALB/c разводки Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины. Мышам 1–й группы (30 животных) под кожу бедра имплантировали по 700 тыс. клеток перевивной МХ–рабдомиосаркомы. Через 4, 7, 10, 14, 17 дней после перевивки опухоли животных забивали под эфирным наркозом (по 6 мышей). Для исследования использовали клетки опухоли, а также лимфоциты регионарных (из паховой области) и отдаленных (из подмышечной области) лимфатических узлов. Мышам 2–й группы (40 животных) в мышцу правого бедра вводили 1 мг МХ в 0,1 мл абрикосового масла. Мышей забивали через 4, 8, 10, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5 и 15 нед (по 4 животных), иссекали опухолевую ткань, а также паховые (регионарные) и подмышечные (отдаленные) лимфатические узлы. Изолированные опухолевые клетки получали после обработки ткани 0,05% раствором трипсина, лимфоциты из лимфатических узлов — путем измельчения ткани последних в гомогенизаторе Поттера.

Противоопухолевое действие лимфоцитов изучали в диффузионных камерах: опухолевые клетки и лимфоциты в соотношении 1: 4 (1 и 4 млн клеток соответственно) помещали в диффузионные камеры, состоящие из тефлоновых колец, на которые с помощью клея БФ–6 наклеивали миллиметровые фильтры диаметром 0,23 мк (Синпор, Чехия). Опухолевые клетки и лимфоциты в диффузионных камерах помещали в 24–луночные планшеты и культивировали в течение 5 сут в среде RPMI 1640 (Сигма, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки при температуре 37°C и насыщении воздушной среды 5% CO₂ [19]. Препараты фиксировали в течение 1 ч в спирт–формоле, окрашивали в протяжении 20 мин гематоксилином Караччи, проводили через спирты восходящей концентрации, просветляли в ксилоле 1 мин. Препараты готовили в капле канадского бальзама на предметном стекле, изучали при помощи микроскопа МБИ–6.

Противоопухолевое действие лимфоцитов определяли по их способности подавлять образование сфероидов опухолевыми клетками.

Для учета особенностей роста эксплантатов опухолей, изолированных опухолевых клеток и их взаимодействия с лимфоцитами была разработана 9–балльная система оценки, которая давала возможность детально охарактеризовать рост опухолевых клеток в диффузионных камерах и представить данные в графическом изображении [20]: 1 — отсутствие роста; 2 — незначительный рост: единичные разрозненные клетки; 3 — начальные этапы опухолевого роста: образование монослоя; 4 — появление монослоя низкой плотности; 5 — образование монослоя средней плотности; 6 — начальные этапы сфероидообразования: конгломераты клеток; 7 — сфероидообразование (1–2 сфероида в поле зрения); 8 — сфероидообразование (3–5 сфероидов в поле зрения); 9 — сфероидообразование (10–12 сфероидов в поле зрения).

Закономерности экспрессии IgM, молекулы адгезии CD54, рецептора к ИЛ–2, а также АПК на опухолевых и лимфоидных клетках на модели перевивной МХ–рабдомиосаркомы, изучали с помощью иммунофлуоресцентного метода, используя соответственно антитела против μ –цепи Ig мышей, антигенов CD54, CD25 (Сигма, США), ИПО–38 (Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого) [21]. При МХ–индуцированном бластомогенезе в опухолевых и лимфоидных клетках изучали экспрессию только АПК, который выявляют с помощью МКАТ ИПО–38.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении взаимодействия опухолевых клеток и лимфоцитов регионарных и отдаленных лимфатических узлов на модели перевивной МХ–рабдомиосаркомы получены следующие результаты. На 7–й день после имплантации животным клеток МХ–рабдомиосаркомы (появление пальпируемого опухолевого узла) противоопухолевое действие лимфоцитов как регионарных, так и отдаленных лимфатических узлов было достаточно выраженным с превалированием противоопухолевого эффекта лимфоцитов регионарных лимфатических узлов: опухолевый рост был незначительным, отмечалась миграция единичных опухолевых клеток, в то время как в контроле наблюдалось образование конгломератов опухолевыми клетками (начальные этапы сфероидообразования) (рис. 1). Указанное противоопухолевое действие сочеталось с выраженной экспрессией CD54 ($38 \pm 3\%$), IgM ($32 \pm 2\%$) и CD25 ($25 \pm 2\%$) на лимфоцитах регионарных лимфатических узлов и лимфоцитах отдаленных лимфатических узлов — 39 ± 3 ; 35 ± 2 и $23 \pm 3\%$ соответственно. В этот период в опухолевых клетках отмечена экспрессия АПК ($41 \pm 2\%$), CD54 ($32 \pm 4\%$) и CD25 ($19 \pm 3\%$) (рис. 2).

На 10–й день после имплантации животным опухолевых клеток противоопухолевое действие лимфоцитов как регионарных, так и отдаленных лимфатических узлов снижалось, и на фильтрах диффузионных камер наблюдалось появление кон-

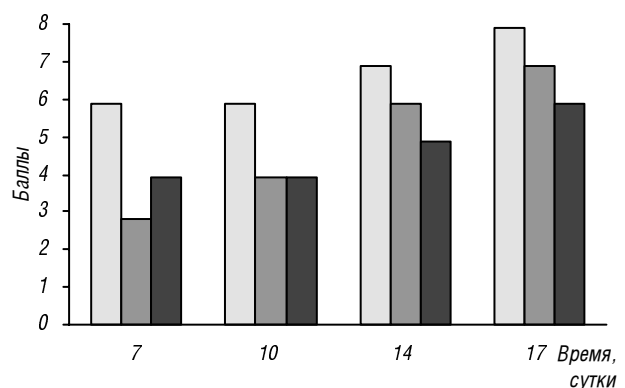


Рис. 1. Действие лимфоцитов на рост клеток перевивной МХ–рабдомиосаркомы у мышей линии BALB/c: опухолевые клетки (□); опухолевые клетки + лимфоциты регионарных лимфатических узлов (▒); опухолевые клетки + лимфоциты отдаленных лимфатических узлов (■)

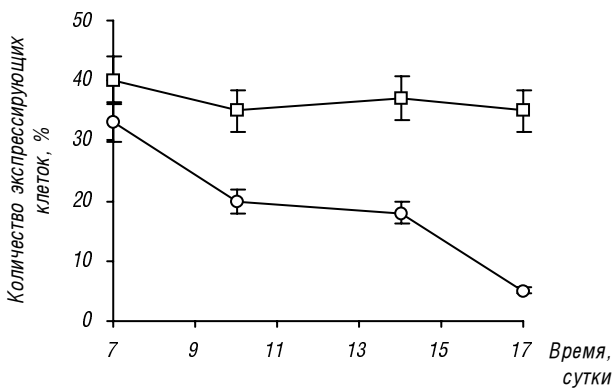


Рис. 2. Экспрессия АПК (□) и антигена CD54 (○) в клетках первичной МХ-рабдомиосаркомы

гломератов опухолевых клеток. Однако по сравнению с контролем, где отмечено сфероидообразование (1–2 сфероида в поле зрения), противоопухолевое действие лимфоцитов оставалось достаточно выраженным (см. рис. 1). В этот период увеличивалось количество лимфоцитов (независимо от локализации), взаимодействующих с МКАТ против IgM, — 52 ± 3 и $50 \pm 3\%$ соответственно.

В терминальных стадиях процесса противоопухолевое действие лимфоцитов регионарных лимфатических узлов резко снижалось — характер роста опухолевых клеток в диффузионных камерах практически приближался к уровню контроля (образование опухолевыми клетками от 1 до 3 сфероидов в поле зрения). В это же время в регионарных лимфатических узлах наблюдалось уменьшение количества лимфоцитов, реагирующих с МКАТ против IgM ($16 \pm 3\%$), CD54 ($18 \pm 2,4\%$) и CD25 ($15 \pm 3\%$). В отличие от этого, лимфоциты отдаленных лимфатических узлов на этом этапе, по сравнению с контролем, еще проявляли противоопухолевое действие, сохраняя высокий уровень экспрессии IgM ($27 \pm 3\%$). На опухолевых клетках в этот период отмечалось снижение уровня экспрессии CD54 до $5 \pm 2\%$, уровень CD25 составлял $11 \pm 3\%$ (см. рис. 2).

При изучении взаимодействия опухолевых клеток и лимфоцитов мышей в условиях модели МХ-индуцированного blastomagenеза получены следующие результаты. На 12-й неделе после начала эксперимента (появление пальпируемого опухолевого узла) противоопухолевое действие лимфоцитов регионарных и отдаленных лимфатических узлов было значительно выражено — опухолевые клетки образовывали монослой низкой плотности по сравнению с присутствием конгломератов опухолевых клеток в контроле (рис. 3). Такая картина сочеталась с экспрессией АПК в 55% лимфоцитов регионарных, в 27% — отдаленных лимфатических узлов и в 28% — опухолевых клеток (рис. 4).

В дальнейшем (13-я неделя после введения МХ) противоопухолевое действие лимфоцитов регионарных и отдаленных лимфатических узлов снижалось (образование монослоя средней плотности, появление конгломератов опухолевых клеток), однако оставалось достаточно высоким по сравнению с

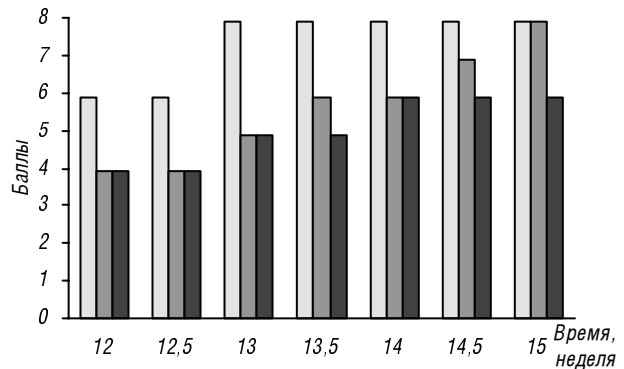


Рис. 3. Действие лимфоцитов на рост опухолевых клеток при МХ-индуцированном blastomagenезе у мышей линии BALB/c: опухолевые клетки (□); опухолевые клетки + лимфоциты регионарных лимфатических узлов (▒); опухолевые клетки + лимфоциты отдаленных лимфатических узлов (■)

контролем (образование сфероидов). В лимфоцитах регионарных и отдаленных лимфатических узлов повышался уровень экспрессии АПК — 61 ± 2 и $45 \pm 4\%$ соответственно (см. рис. 4).

В терминальных стадиях опухолевого процесса (14–15-я неделя) противоопухолевое действие лимфоцитов регионарных лимфоузлов продолжало снижаться, рост в диффузионных камерах достигал уровня контроля, в то время как лимфоциты отдаленных лимфатических узлов продолжали оказывать противоопухолевое действие, которое проявлялось в уменьшении сфероидообразования опухолевыми клетками (1 сфероид в поле зрения) по сравнению с контролем (3–5 сфероидов). В этот же период количество лимфоцитов в регионарных и отдаленных лимфатических узлах, взаимодействующих с ИПО-38, уменьшалось. При этом в опухоле-

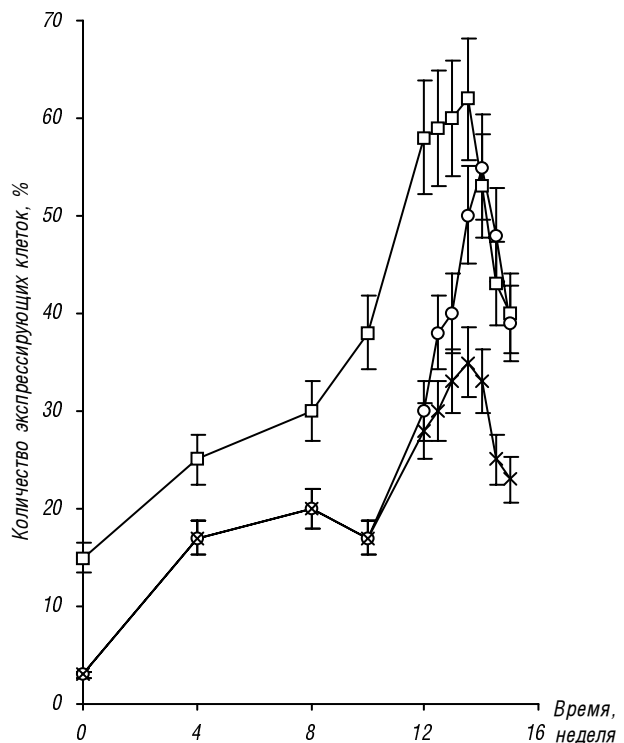


Рис. 4. Экспрессия АПК в опухолевых клетках (*), лимфоцитах регионарных (○) и отдаленных (□) лимфоузлов при МХ-индуцированном blastomagenезе

вых клетках снижалась экспрессия АПК до $24 \pm 2\%$.

Сравнительный анализ результатов изучения противоопухолевого действия лимфоцитов мышей позволил выявить следующие закономерности. Во-первых, лимфоциты регионарных лимфатических узлов обладали более выраженным противоопухолевым действием, чем лимфоциты отдаленных, что наблюдалось как в отношении лимфоцитов мышей с перевивной МХ–рабдомиосаркомой, так и при МХ–индуцированном бластомогенезе. Во-вторых, противоопухолевое действие лимфоцитов мышей с перевивной МХ–рабдомиосаркомой было более выраженным, чем с индуцированной опухолью. В-третьих, в терминальных стадиях опухолевого процесса при перевивной МХ–рабдомиосаркоме сохраняется незначительное противоопухолевое действие лимфоцитов регионарных и отдаленных лимфатических узлов, в то время как при индуцированном бластомогенезе лимфоциты регионарных лимфатических узлов уже не проявляют подобного действия.

Выявление возможной корреляции между экспрессией исследованных молекул в опухолевых клетках и лимфоцитах и противоопухолевым действием последних показало следующее. Оказалось, что выраженное противоопухолевое действие лимфоцитов мышей с перевивной МХ–рабдомиосаркомой сочетается с высоким уровнем экспрессии CD54 (на начальных стадиях процесса) и IgM, из чего следует, что противоопухолевое действие лимфоцитов при их взаимодействии с опухолевыми клетками может зависеть от экспрессии этих молекул.

Полученные результаты показали, что экспрессия молекул адгезии как на опухолевых клетках, так и на лимфоцитах коррелирует с реализацией противоопухолевого действия последних. Эти данные подтверждены исследованиями других авторов. Установлено, что культивирование активированных лимфоцитов с анти-CD54–антителами приводит к снижению их функциональной активности [10]. Цитотоксичность ИЛ–2–активированных естественных киллеров регулируется уровнем CD44 и CD11/CD18 на клетках фибросаркомы MC57L [22]. Относительно значения молекул адгезии на опухолевых клетках можно отметить, что уровень экспрессии на клетках различных линий остеосаркомы и фибросаркомы молекул клеточной адгезии CD54 и CD58 коррелирует с чувствительностью опухолевых клеток к лизису естественными киллерами и лимфокин–активированными клетками [9, 23]. Показано, что обработка клеток фибросаркомы MCA 205 анти-CD11a–антителами блокирует CD54–зависимую инфильтрацию опухолевых клеток Т–лимфоцитами [7].

К этому следует добавить, что при оценке уровня экспрессии молекул адгезии необходимо учитывать фазу клеточного цикла. Так, исследование антигена CD54 и CD58 на клетках Daudi показало, что их экспрессия значительно выше в S– и G₂–фазах клеточного цикла, чем в G₀/G₁ [8]. Отмеченное отсутствие экспрессии антигена CD54 на опухолевых

клетках и снижение на лимфоцитах параллельно с ослаблением их противоопухолевого действия (терминальные стадии) в определенной степени может служить свидетельством необходимости присутствия CD54 на опухолевых клетках для реализации противоопухолевого действия лимфоцитов.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить ряд особенностей взаимодействия лимфоцитов регионарных и отдаленных лимфатических узлов с опухолевыми клетками в условиях двух экспериментальных моделей: перевивной МХ–рабдомиосаркомы и МХ–индуцированной опухоли.

Выражаем благодарность сотрудникам отдела механизмов противоопухолевой терапии С.В. Михалоп и А.Г. Бердовой за предоставленные МКАТ ИПО–38.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pinchouk VG, Berezhnaya NM. Regularities of tumor cell growth during their interaction with interleukin-2 and autologous lymphocytes activated with IL-2. In: Intern Conf on Tumor Microenvironment Progression Therapy & Prevention. Tiberias, Beit Gabriel, Israel, 1995: 69.
2. Hanahan D. Angiogenesis, metastasis, and the failure of tumor immunity during multistage tumorigenesis. In: Intern Conf on Tumor Microenvironment Progression Therapy & Prevention. Tiberias, Beit Gabriel, Israel, 1995: 14.
3. Arte RN, Dvorkin T, Fima E, Douvdevani A, Zoller M, Shimoni N, Bar-Haim E, Vorov E, Hacham M, Benharros D, Segal S. Regression of IL-1 alpha-positive fibrosarcomas; mechanisms of tumor rejection and immunotherapeutic applications. In: Intern Conf on Tumor Microenvironment Progression Therapy & Prevention. Tiberias, Beit Gabriel, Israel, 1995: 21.
4. Berezhnaya NM, Osipova EV, Kovalchuk EV, Konvalenko VF, Trembach AM, Gordienko SM. The evidence of possibility of interleukin-2 receptor expression on human solid tumors of different histogenesis. *Exp Oncol* 1994; **16**: 40–7.
5. Carloni G, Paterson H, Mareel M, Augery-Bourget Y, Sahraoui J, Rubinstein E, Suarez H, Azzarone B. N-ras dependent revertant phenotype in human HT1080 fibrosarcoma cells is associated with loss of proliferation within normal tissues and expression of an adult membrane antigenic phenotype. *Oncogene* 1989; **4**: 873–80.
6. Lefor AT, Fabian DF. Enhanced cytolytic activity of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) derived from an ICAM-1 transfected tumor in a murine model. *J Surg Res* 1998; **75**: 49–53.
7. Mukai S, Kagumu H, Shu S, Plautz GE. Critical role of CD11a (LFA-1) in therapeutic efficacy of systemically transferred antitumor effector T cells. *Cell Immunol* 1999; **192**: 122–32.
8. Ejiri Y, Ohara M, Suzuki T, Kasukawa R. Cancer cell cycle and adoptive immunotherapy using lymphokine-activated killer cells. *Fukushima J Med Sci* 1997; **43**: 61–73.
9. Mariani E, Tarozzi A, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A. TNF-alpha but not IL-1 and IL-6 modifies the susceptibility of human osteosarcoma cells to NK lysis. *Int J Oncol* 1998; **13**: 349–53.
10. Sancho D, Yanez-Mo M, Tejedor R, Sanchez-Madrid F. Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15. *Blood* 1999; **93**: 886–96.

11. **Le Guiner S, Le Drean E, Labarriere N, Fonteneau JF, Viret C, Diez E, Jotereau F.** LFA-3 co-stimulates cytokine secretion by cytotoxic T lymphocytes by providing a TCR-independent activation signal. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 1322–31.
12. **Mohamadzadeh M, DeGrendele H, Arizpe H, Estess P, Siegelman M.** Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *J Clin Invest* 1998; **101**: 97–108.
13. **Reiss Y, Hoch G, Deutsch U, Engelhardt B.** T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium *in vitro*: essential role for ICAM-1 and ICAM-2 in transendothelial migration of T cells. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 3086–99.
14. **von Leoprechting A, van der Bruggen P, Pahl HL, Aruffo A, Simon JC.** Stimulation of CD40 on immunogenic human malignant melanomas augments their cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis and induces apoptosis. *Cancer Res* 1999; **59**: 1287–94.
15. **Martin-Fontecha A, Assarsson E, Carbone E, Karre K, Ljunggren HG.** Triggering of murine NK cells by CD40 and CD86 (B7-2). *J Immunol* 1999; **162**: 5910–6.
16. **Lang S, Whiteside TL, Lebeau A, Zeidler R, Mack B, Wollenberg B.** Impairment of T-cell activation in head and neck cancer *in situ* and *in vitro*: strategies for an immune restoration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; **125**: 82–8.
17. **Takenoyama M, Yasumoto K, Harada M, Sugimachi K, Nomoto K.** Antitumor response of regional lymph node lymphocytes in human lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1998; **47**: 213–20.
18. **Perez J, Day MJ, Mozos E.** Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumor at different stages of growth. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; **64**: 133–47.
19. **Бережная НМ, Горецкий БА.** Интерлейкин-2 и злокачественные новообразования. Киев: Наук думка, 1992. 172 с.
20. **Бережная НМ, Ковальчук ЕВ, Денисевич ТВ, Осипова ЕВ, Коноваленко ВФ, Тостолятов БА, Трембач АМ, Процик ВС, Воробьева ЛН, Пинчук ВГ.** Сравнительная оценка особенностей влияния иммуномодуляторов различного происхождения на рост эксплантатов и изолированных опухолевых клеток человека и животных. *Эксперим онкол* 1995; **17**: 125–8.
21. **Спивак СИ, Винничук ЮД, Бережная НМ.** Экспрессия различных структур на опухолевых клетках и лимфоцитах при росте перевивной МХ-рабдомиосаркоме и бластомогенезе, индуцированном метилхолантроном у мышей линии BALB/c. *Эксперим онкол* 1999; **21**: 111–7.
22. **Matsumoto G, Nghiem MP, Nozaki N, Schmits R, Ponniger JM.** Cooperation between CD44 and LFA-1/CD11a adhesion receptor in lymphokine-activated killer cell cytotoxicity. *J Immunol* 1998; **160**: 5781–9.
23. **Burno DK, Fabian DF, Lefor AT.** ICAM-1 increases *in vitro* adhesion and cytotoxicity in a murine fibrosarcoma. *J Surg Res* 1996; **60**: 398–402.