

## ПРОЛІФЕРАЦІЯ І ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЛІНІЇ К 562 IN VIVO

*У статті досліджено процеси проліферації та диференціювання клітинної лейкозної лінії К 562 з використанням гелевих дифузійних камер. Отримано модель регульованої диференціації клітин цієї лінії за даних умов. З'ясовано роль радіаційного чинника та анемізації як стимуляторів процесу диференціювання клітин лінії К 562.*

### Вступ

Сучасні уявлення про вагому роль стовбурових клітин та клітин-попередників у становленні і розвитку лейкозів знаходять підтвердження і при лейкозах тварин, і при лейкозах людини. Регуляція їх проліферації і комітування відбувається під контролем генів, що відповідають за самопідтримання клітин та експресію фенотипових маркерів диференціювання. Дуже перспективним вважається напрям з'ясування характеру порушень у геномі в процесі диференціювання при злоякісному перетворенні нормальних кровотворних клітин.

Згідно з клоновою теорією, ріст лейкозної популяції починається з однієї клітини, а швидкість росту залежить від частки активно проліферуючих клітин, їх генераційного часу, кількості клітин із обмеженою тривалістю життя, швидкості втрати клітин.

Процес можливої диференціації лейкозних клітин під впливом тих чи інших чинників викликає все більше зацікавлення дослідників. Не до

кінця з ясованими залишаються питання природи чинників, які спрямовують цей процес у тому чи іншому напрямку. Після висвітлення цих питань з'явиться можливість застосовувати метод спрямованої диференціації як засіб для лікування хронічного мієлолейкозу та інших лейкозів.

Метою дослідження є розробка моделі регульованої диференціації гемопоетичних клітин і оцінка морфофункціональних характеристик ранніх клітин-попередників гемопоезу при лейкозному процесі в культурі тканин in vivo з використанням стовбурової клітинної лейкозної лінії К 562. У роботі досліджено проліферативну активність кровотворних клітин-попередників і найближчих їх нащадків при лейкозі для визначення їх потенціальних можливостей до проліферації і диференціювання. Застосовувались методи клітинних культур in vivo, цитологічні, цитохімічні, молекулярні і статистичні методи досліджень. Важливим у роботі є використання оригінальних гелевих дифузійних камер, що дають можливість дослідити ці процеси in vivo.

### Матеріали та методи

Дифузійні камери мали вигляд м'яких еластичних пористих капсул заввишки 0,7 см і діаметром 1,5 см, виготовлених із полімерного матеріалу. Капсула має постійний хімічний склад, задані дифузійні параметри і високу прозорість. Вона еластична і м'яка, що запобігає формуванню навколо неї фіброзної тканини навіть за умови тривалого культивування. Внутрішня порожнина абсолютно непроникна для клітин ззовні [1].

У напіврідкому агаровому гелі (для дослідження попередників) або у поживному середовищі (для суспензійних культур) клітини вводили шляхом проколу бічної стінки ін'єкційною голкою у внутрішню порожнину камери. Камери занурювали в черевну порожнину мишей, оброблених раніше одним із способів, що дає змогу одержати ріст тих або інших клітин-попередників. Як реципієнтів камер використано статевозрілих мишей лінії СВА у віці 6-8 тижнів, вагою 16-18 г, яких утримували в умовах віварію Інституту біохімії ім. А. А. Палладіна на раціоні, відповідному загальноприйнятим нормам. Операцію мишам проводили за допомогою парентерального введення 1% тіопенталу натрію (0,2-0,3 мл). У черевну порожнину кожної тварини вводили по дві камери. Лінію розрізу зашивали пошарово шовковою ниткою.

Для дослідження гранулоцито-моноцитарних клітин-попередників проводили обробку мишей за допомогою підшкірного введення їм за добу до досліду циклофосфаміду з розрахунку 250 мг на 1 кг ваги тварини або опромінювання у сублетальній дозі, що сприяло підвищенню колонієстимулюючої активності і супресії імунологічної реактивності тварини. Опромінювання тварин проводили за добу до експерименту на обладнанні РУМ-17.

Анемізації тварин, що стимулює бурстпромоторну активність, досягали шляхом введення гемолітичної отрути (фенілгідразину). Мишам підшкірно вводили по 0,2 мл фенілгідразину з розрахунку 60 мг/кг маси тварини, перед експериментом на 1-й і 2-й день. Введення фенілгідразину за схемою забезпечувало тривалу, порівняно з терміном обліку експерименту, анемізацію мишей-реципієнтів камер [6]. Контроль за ступенем анемізації тварин проводили на підставі визначення кількісних і якісних показників їх крові: гемоглобіну в г/л, кількості еритроцитів із розрахунку на 1 л, формених елементів крові.

Реакцію гібридизації здійснювали із суміші, що складається з реактиву Денхарта (0,02 %), бичачого сироваткового альбуміну (0,02 %), фіколу, 0,02 % полівінілгідролідону, стандартного сольового розчину (0,15 М NaCl, 0,03 М цитрату натрію), 0,1 % додецилсульфату натрію і трис-НСІ

буферу, рН 8,0. Як зонд застосовували плазмідну РВР-322, що містить кДНК  $\beta$ - і  $\alpha$ -глобіну. Частину препаратів фіксували у 3 % формаліні для цитохімічного фарбування. З цієї метою застосовували такі методики: визначення активності мієлопероксидази (МПО 1.11.1.7) за Loele, кислій фосфатази (КФ 3.1.3.2) за Goldberg і Barka, лужної фосфатази (КФ 3.1.3.1) за Kaplow, полісахаридів (PAS-реакція за Мак-Манусом і Хочкису) [4].

### Результати дослідження

Вивчення характеру колонієутворення в культурі клітинами лінії К 562 набуває особливо важливого значення у зв'язку з необхідністю з'ясувати особливості функціонування кровотворних клітин-попередників у плані формування онкогематологічної патології.

Було доцільним на прикладі лейкоемічної лінії людини К 562 показати, чи здатні лейкоемічні клітини до диференціації і дозрівання в процесі тривалого культивування *in vivo* в інтактному і опроміненому організмі тварини-реципієнта та продемонструвати в експерименті результати дії радіаційного чинника на процеси проліферації і диференціації кровотворних клітин на ранніх етапах їх розвитку.

Дослідження останніх років показали, що лейкоемічні клітини К 562 зберігають у собі потенційну здатність до диференціювання в різних напрямках за певних умов, тобто є плюрипотентною, лейкоемічною стовбуровою клітинною лінією. До того ж синтез глобіну, гемоглобіну і специфічної мРНК є оборотним після припинення дії індуктора [18]. У цих дослідженнях проведено вивчення морфо-біохімічних характеристик клітин К 562 у процесі їх тривалого культивування в дифузійних гелевих камерах. Таке дослідження проведено з метою з'ясування потенційної здатності лейкоемічних клітин до диференціації. Більш того, було доцільним здійснити аналіз отриманих популяцій та їхньої специфічності щодо окремих типів гемоглобіну. Відтворення цих подій важливе як для розуміння патогенезу пухлинних захворювань кровотворних органів, так і механізмів дії на гемопоез стресових чинників, у тому числі і радіаційного. Проведено морфологічні дослідження клітин лінії К 562 в динаміці їх тривалого культивування у дифузійних гелевих камерах (6 серій експериментів на 30 мишах лінії СВА, з розрахунку 5 тварин на експеримент).

Зростання числа клітин на 30-ту і 45-ту добу супроводжується збільшенням еритроїдної популяції клітин (рис. 1, 2). Відзначають дозрівання ядер еритрокаріоцитів, хоча мегалобластні риси продовжують зберігатися. Хроматин ядер - конденсований. Цитоплазма - фестончаста з вакуолізацією.

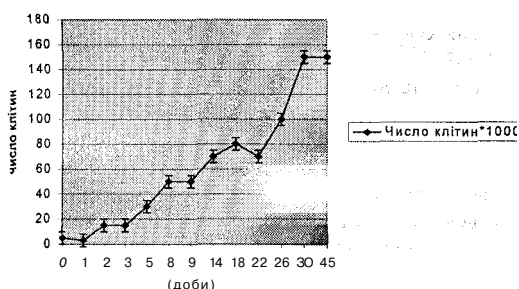


Рис. 1. Кінетика росту лейкемічної лінії К 562 у тривалій культурі in vivo

Вивчення наявності бензидинпозитивних фракцій білків у початковому лізаті лінії клітин К 562 показало таке: виявляють лише дві швидко мігруючі слабозабарвлені бензидином фракції, їх позитивна реакція на бензидин свідчить про наявність групи гему. На 14-ту добу в культурі виразно виявляється сім бензидинпозитивних фракцій. Ці дані узгоджуються із результатами цитохімічного аналізу і підтверджують висновок про те, що саме до цього терміну в культурі з'являються клітини, які посилено синтезують гемопротейди включно з гемоглобіном. Аналіз вмісту вільних амінокислот у клітинах, зроблений на підставі аналізу даних йонно-обмінної хроматографії на приладі Biotronic, показує, що в період з 6-ї до 14-ї доби спостерігається збільшення вмісту таурину, аспарагінової кислоти, цитруліну, орнітину, 1-метилгістидину.

Разом із тим зменшується вміст цистеїну і триптофану. Отримані дані свідчать про інтенсифікацію азотного обміну у культивованих клітинах, що зумовило активацію орнітинового циклу як шляху детоксикації аміаку, що свідчить про спрямовану диференціацію клітин.

Експерименти з гібридизації тотальної РНК і полі А-вмісної мРНК клітин лінії К 562 і з кДНК  $\beta$ - і  $\alpha$ -глобінових генів [8] підтверджують, що через 21 добу культивування у ГДК у них утворюються мРНК  $\alpha$ -глобіну. Такий висновок ґрунтується на аналізі радіоавтографів. Через 14-21 добу від початку культивування знайдено слабкі сигнали при нанесенні на нітроцелюлозний фільтр РНК із цих клітин на тлі виразних сигналів у разі позитивних контролів (відповідно 50 і 10 мг РНК у плямі) та відсутність сигналу у разі негативного контролю (без РНК). При цьому

рівень сигналу значно вищий для проб, які оброблено зондом у вигляді кДНК  $\alpha$ -глобінового гену, ніж для проб, які гібридизували із кДНК  $\beta$ -глобінового гену. Це може свідчити про більшу інтенсивність транскрипції  $\alpha$ -, ніж  $\beta$ -глобінового гену. Проте експресується лише  $\alpha$ -глобіновий ген, а наявність слабого сигналу при обробці проб зондом із кДНК  $\beta$ -глобінового гену є віддзеркаленням лише перехресної реакції між послідовностями через схожість їх консервативних ділянок.

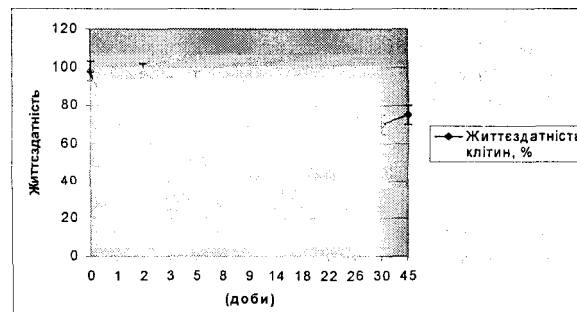


Рис. 2. Життєздатність клітин лінії К 562, культивованих in vivo

Таким чином, проведений нами морфобіохімічний аналіз клітин лінії К 562, культивованої у гелевих камерах, показав, що при тривалому рості в цих умовах у культурі in vivo досягається проліферація і диференціація кровотворних клітин при збереженні високого рівня їх життєздатності. До 14-ї - 21-ї доби в клітинах різко посилюється азотний обмін. Цитохімічний аналіз, а також вивчення фракційного складу тотальних білків щодо реакції на бензидин показує, що в даний період у клітинах нагромаджуються бензидинпозитивні білки, тобто білки, що містять у своєму складі групу гему. І нарешті, прямими експериментами з дот-гібридизації РНК із зондами  $\alpha$ - і  $\beta$ -глобінових генів встановлено наявність у клітинах цього періоду розвитку  $\alpha$ -глобінових мРНК. Крім того, рекультивування у напіврідкому агаровому середовищі дає можливість виявити еритроїдні клітини-попередники завдяки утворенню ними колоній-клонів, які є прямим свідченням того, що у культурі присутні клітини з колонієутворюючим потенціалом.

Показано, що під впливом радіаційного чинника відбувається стимуляція процесу диференціації клітин лінії К 562.

1. Білько Н. М. Спосіб виготовлення камери для культивування клітин. Патент України № 2692 від 15.04.94. // Офіційний бюлетень «Промислова власність». - 1994. - № 5. - С 218.
2. Ільницька О. М., Мазур І. Я., Ігуменцева Н. /., Дробот Л. Б. Вивчення регуляції фосфатидилінозит 3-кіназного сигнального шляху в процесі гербіміцин А-індукованої еритроїдної диференціації клітин еритролейкемії людини лінії К 562 // Укр. біохім. журн. - 2001. - Т. 73. - № 2. - С 106-109.

3. Барановский М. А. Дифференцировка нормальных и лейкозных клеток в условиях эксплантации и факторы ее стимуляции // Механизмы лейкемогенеза. - К.: Наук. Думка, 1975. - С.159-180.
4. Глузман Д. Ф. Диагностическая цитохимия гемобластозов. - К.: Наук. думка, 1978.-214 с.
5. Глузман Д. Ф., Бебешко В. Г., Надгорная В. А. и др. Эмбриональное кроветворение и гемобластозы у детей. - К.: Наук. думка, 1988.-200 с.

6. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Шахов В. П. Методы культуры ткани в гематологии. - Томск: изд-во Томск, ун-та, 1992. - 273 с.
7. Дробот Л. Б., Хузац З. и др. Переходящая активация PI RAS в процессе эритроидной дифференцировки клеток человека K 562, индуцированной гербимицином А // Экспериментальная онкология. - 2005. - Т. 27. - № 1. - С. 67-75.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 1984. - 59 с.
9. Фрейфельд Е. И. Гематология. - М.: Медгиз, 1947. - 442 с.
10. Frigon N., Shao L., Young A. et al. Regulation of globin gene expression in human K 562 cells by recombinant activin A // Blood. - 1992. - 97. - № 3. - P. 765-772.
11. Honma G., Kasukabe T., Hozumi M. Induction of lysocyme activity by adenosine 3'5'-cyclic monophosphate in cultured mouse myeloid leukemic cells. Biochem. and Biophys. Res. Commun. - 1978. - Vol. 82. - № 10. - P. 1246-1250.
12. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. - 1970. - 227. - № 5259. - P. 680-685.
13. Landau T., Sachs L. Characterization of the induced required for the development of macrophage and granulocyte colonies. - Proc. Nat. Acad. Sci. - 1971. - Vol. 68. - № 12. - P. 2540-2544.
14. Lotem J., Sachs L. Control of Fc and C<sub>3</sub> receptors on myeloid leukemic cells. - J. Immunol. - 1976. - Vol. 117. - № 5. - P. 580-583.
15. Luzzio C., Luzzio B. Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome // Blood. - 1975. - 45. - P. 321-334.
16. Nowell P. Differentiation of human leukemic leukocytes in tissue culture. - Exp. Cell Res. - 1960. - Vol. 19. - № 3. - P. 267-277.
17. Sakagami H., Unten S., Konno K. Close association of mouse myeloid leukemia (M1) cell differentiation with cessation of DNA synthesis. - Cell Struct. and Funct. - 1981. - Vol. 6. - P. 147-157.
18. Shao L., Frigon N., Young A. et al. Effect of activin A on globin gene expression in purified human erythroid progenitors // Blood. - 1992. - Vol. 97. - № 3. - P. 773-781.
19. Steiner R. On the kinetics of erythroid cell differentiation in fetal mice. DNA and haemoglobin measurements of individual erythroblasts during gestation // J. Cell. Physiol. - 1973. - Vol. 82. - № 2. - P. 213-230.
20. Yang L., Heng H. et al. Alternative promoters and polyadenylation regulate tissue-specific expression of hemogen isoforms during hematopoiesis and spermatogenesis // Dev. Dyn. - 2003. - Vol. 228. - № 4. - P. 606-616.

*Bilko N., Barash O. Borbulyak I.*

## PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF THE CELL CULTURE K 562 IN VIVO

*The processes of proliferation and differentiation of the leucosis cell culture K 562 are assessed, using gel diffusion chambers. The model of regulated differentiation at these circumstances is obtained. The role of radiation factor and anemisation as the stimulators of the process of differentiation is cleared.*