

Дослідження ролі трансформуючих факторів росту у хворих на СНІД та саркому Капоші

Р. С. Стойка, І. А. Якимович, С. В. Антоненко¹, О. В. Барбашева¹,
А. Л. Воронцова², Ю. Й. Кудрявцев², О. О. Фільченков²

Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
290005, Львів, вул. Драгоманова, 14/16

¹ Науково-дослідний інститут епідеміології та інфекційних захворювань ім. Л. В. Громашевського МОЗ України
252038, Київ, узвіз Протасів Яр, 4

² Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України
252022, Київ, вул. Васильківська, 45

Раніше ми виявили, що трансформуюча активність факторів росту в сироватці крові хворих на СНІД і саркому Капоші є значно вищою, ніж у сироватці крові здорових донорів. Цю активність оцінювали за здатністю сироватки індукувати субстратнезалежний ріст нормальних фібробластів миші лінії NIH-3T3 у напіврідкому культуральному середовищі, що містило 0,33 % агару. У цій роботі показано, що лікування хворих на саркому Капоші лафероном (рекомбінантний $\alpha 2b$ -інтерферон) супроводжувалося значним зниженням рівня трансформуючої активності в сироватці крові, яке позитивно корелювало із суттєвим покращанням стану їх здоров'я. Для вивчення ролі трансформуючих факторів росту в модульованні цитопатичного ефекту ВІЛ-інфекції було використано лінію MT-4 Т-лімфобластоїдних клітин, інфікованих BRU-штамом ВІЛ-1 (модель гострої літичної інфекції) або ПІВ-штамом цього вірусу (модель хронічної інфекції). Цитопатичні ефекти ВІЛ визначали, підраховуючи відсоток мертвих клітин та кількість клітинних синцитіїв. Крім того, встановлювали вміст білка р24. Показано, що трансформуючий фактор росту β та/або епідермальний фактор росту (аналог трансформуючого фактора росту α) збільшували негативні впливи ВІЛ-1 в експериментальній моделі гострої інфекції. Вплив цих факторів не був таким однозначним, коли аналізували результати дослідження клітинної моделі хронічної інфекції. Отже, ВІЛ-інфекція супроводжується зростанням трансформуючої активності факторів росту в сироватці крові хворих на СНІД, і ці фактори росту можуть бути відповідальними за цитопатичні ефекти, які спостерігаються у хворих на СНІД.

Вступ. Відомо, що поліпептидні фактори росту відіграють важливу роль у регуляції проліферації та диференціації клітин у тварин та людини [1]. Отримано дані стосовно того, що вміст окремих факторів росту та їх співвідношення у тканинах та біологічних рідинах можуть помітно змінюватися під час різних патологічних процесів [2]. Є підстави вважати, що деякі фактори росту беруть участь у регуляції біохімічних процесів протягом розвитку ВІЛ-інфекції [3]. Нез'ясованими залишаються молекулярні механізми, які забезпечують

високу частоту появи онкологічних захворювань у хворих на СНІД. У цьому зв'язку необхідно відзначити, що деякі фактори росту мають здатність індукувати фенотипову трансформацію клітин [4], а трансформуючий фактор росту (ТФР) β має імуносупресивну активність [5].

Виходячи з наведених даних метою роботи було дослідження можливої ролі ТФР у сироватці крові хворих на СНІД та на саркому Капоші (СНІД-асоційоване онкологічне захворювання [6]). Зокрема, вивчали, як змінюється активність ТФР у сироватці крові хворих на саркому Капоші під час їх успішного лікування лафероном (рекомбінантний $\alpha 2b$ -інтерферон). Крім того, дослід-

© Р. С. СТОЙКА, І. А. ЯКИМОВИЧ, С. В. АНТОНЕНКО,
О. В. БАРБАШЕВА, А. Л. ВОРОНЦОВА, Ю. Й. КУДРЯВЦЕВ,
О. О. ФІЛЬЧЕНКОВ, 1997

жували, як впливають окремі ТФР на цитопатичний ефект ВІЛ у клітинних моделях гострої та хронічної ВІЛ-інфекції.

Матеріали та методи. *Фактори росту.* Епідермальний фактор росту (ЕФР) очищали з підщелепних слинних залоз миші за допомогою гідрофобної хроматографії [7]. ТФР- β очищали зі свіжовиділених тромбоцитів крові свині [8].

Клітини та їх культивування. Нормальні фібробласти лінії NIH-3T3 з ембріонів миші було отримано з колекції клітинних культур Інституту цитології РАН (Санкт-Петербург). Клітини вирощували у середовищі Ігла, модифікованому Дальбекко (DMEM) («Flow Lab.», Велика Британія), з додаванням 10 % сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби («ДИАЛЕК», Білорусь). Клітинні культури інкубували при 37 °С в атмосфері 5 % CO₂/95 % повітря при 100 % вологості.

Колонієутворення клітин в агаризованому середовищі. Рівень фенотипової трансформації клітин лінії NIH-3T3 визначали за інтенсивністю їх субстратнезалежної проліферації. Для цього у пластикові чашки Петрі (діаметр 40 мм, Завод медичних полімерів, Санкт-Петербург, Росія) заливали 1 мл середовища для культивування (DMEM, 10% ембріональної сироватки крові), що містило 0,5 % агару («Difco», США). На цю підкладку у кожну чашку вносили 1 мл суспензії клітин (10⁴), яку готували у середовищі для культивування, що містило 0,33 % агару і 10 % тестованої сироватки крові. Чашки з клітинами витримували протягом 14 діб в атмосфері 5 % CO₂ і 95 % повітря при 37 °С і 100 % вологості. Після завершення інкубації підраховували кількість клітинних колоній, що мали у діаметрі понад 50 мкм. У кожній пробі використовували 3—4 чашки Петрі з клітинами.

Дослідження цитопатичного ефекту ВІЛ у інфікованих клітинах. Використовували клітини лінії MT-4 людини (Т-лімфобластоїдна лінія). Клітини інфікували різними лабораторними штамами вірусу — BRU (отриманий з лабораторії L. Montagnier, Франція) та ПІВ (з лабораторії R. Gallo, США). Згідно з результатами порівняльного дослідження, клітинна система MT-4/BRU вважається експериментальною моделлю гострої літичної інфекції ВІЛ, а клітинна система MT-4/ПІВ — моделлю хронічної інфекції Т-лімфоїдних клітин.

Клітини культивували у вигляді суспензії ((0,3—1,0) · 10⁶ клітин в 1 мл) у середовищі RPMI-1640 (Інститут поліомієліту та вірусних енцефалітів РАМН, Москва) з додаванням 10 % сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби («BioMark», Львів), L-глутаміну (300 мкг/мл) та гентаміцину (100 мкг/мл).

Клітини лінії MT-4 інфікували внесенням ВІЛ-вмісного культурального середовища, отриманого від постійно інфікованих клітинних систем MT-4/BRU чи MT-4/ПІВ. Кількість рідини для інфікування складала 0,2 мл/1 млн клітин, а вміст у ній вірусного білка р24 становив 20—25 нг/мл. Клітини інкубували в присутності вірусу при 37 °С протягом 1 год. Після цього їх промивали свіжим культуральним середовищем, і 2 мл суспензії клітин у такому середовищі (0,5 · 10⁶ клітин/мл) поміщали в лунки 24-лункового пластикового планшета («Costar», США). Клітини інкубували протягом 1, 5, 10 та 15 діб в CO₂-інкубаторі (37 °С, 5 % CO₂, 100 % вологості).

Для вивчення впливу ТФР на деякі біологічні властивості вищезгаданих клітинних моделей ці фактори росту (ЕФР — структурно-функціональний аналог ТФР- α та ТФР- β) додавали до тестованих клітин у кінцевій концентрації 10 нг/мл клітинної суспензії.

Цитопатичний ефект інфікування клітин ВІЛ оцінювали за кількістю утворених клітинами синцитіїв, підраховуючи їх у кожній лунці під інвертованим світловим мікроскопом. Розрахунок здійснювали за кількістю синцитіїв на 1000 живих клітин. Питомий вміст живих чи мертвих клітин у культурі визначали в камері Горяєва після забарвлення клітин 0,2 % розчином трипанового синього.

Дослідження експресії білка р24 ВІЛ. Вивчення активності реплікації ВІЛ у клітинних культурах здійснювали, визначаючи рівень продукції вірусного білка р24. Вміст останнього в культуральному середовищі знаходили, використовуючи набір фірми «Vironostica» (США).

Лікування лафероном хворих на саркому Капоші. З метою лікування використовували лаферон — α 2b-інтерферон (рекомбінантний), отриманий в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України і дозволений фармакологічним комітетом для клінічного застосування. Схема лікування була наступною [10]: спочатку проводили курс хіміотерапії цитостатиком проспидином у разовій дозі 150 мг/м² щоденно дом'язово протягом 7 днів (сумарна доза становить 1050 мг/м²); після цього підшкірно вводили лаферон у дозі 2 млн од/м² щоденно протягом 10 днів (сумарна доза 20 млн од/м²). Описаний курс лікування повторювали у повному обсязі через місяць. Після досягнення ремісії захворювання проводили підтримуючі курси лаферонотерапії (4 введення по 1 млн од.) протягом місяця. У хворих забирали кров, отримували з неї сироватку і визначали в ній активність ТФР, як описано раніше.

Статистичний аналіз. Для встановлення ста-

тистичної вірогідності змін рівня активності ТФР використовували *t*-критерій Стьюдента.

Результати та обговорення. Порівняння трансформуючої активності факторів росту у сироватці крові здорових донорів та хворих на СНІД і саркому Капоші засвідчило, що обидва захворювання супроводжуються суттєвим зростанням рівня активності ТФР у сироватці крові [9]. У середньому активність ТФР у сироватці крові хворих на СНІД була у 15 разів, а у хворих на саркому Капоші — у 16,5 разів вищою за таку у сироватці крові здорових донорів.

Для того щоб встановити, чи дійсно рівень активності ТФР у сироватці крові хворих на саркому Капоші (СНІД-асоційоване захворювання) корелює зі станом здоров'я пацієнтів, цю активність було визначено до і після курсу лікування хворих лафероном (рекомбінантний $\alpha 2b$ -інтерферон). Схема лікування описана в [10]. З даних, наведених у таблиці, видно, що ефективне лікування лафероном у комплексі з проспідіном хворих на саркому Капоші супроводжується нормалізацією рівня активності ТФР у сироватці їхньої крові.

Оскільки рівень активності ТФР у сироватці крові хворих на СНІД є також суттєво підвищеним, можна припустити, що і в цьому випадку ефективність лікування може оцінюватися на підставі даних про його зміну.

Після з'ясування того, що у хворих на СНІД має місце значно підвищений рівень активності ТФР у сироватці крові, закономірно постало питання про те, як впливають окремі ТФР на цитопатичний ефект ВІЛ та на рівень експресії ВІЛ в інфікованих клітинах. Існують два основні типи ТФР — α та β [11—13]. Раніше [14] показано, що

максимальне зростання рівня колонієутворення нормальних мишачих фібробластів лінії NIH-3T3 спостерігається при одночасній дії на них ТФР- β та ЕФР (структурно-функціональний аналог ТФР- α [15]). Сам ТФР- β не мав такого впливу.

З метою дослідження ролі окремих ТФР у модуляції ефекту ВІЛ ми використали дві клітинні системи, що вважаються експериментальними моделями гострої літичної інфекції та хронічної інфекції. Встановлено, що Т-лімфобластоїдні клітини лінії MT-4/BRU (модель гострої інфекції) характеризуються максимальним рівнем експресії вірусного антигена p24 (рис. 1, а) та утворенням клітинних синцитіїв (рис. 1, б) на 5-ту добу інфікування клітин ВІЛ з наступним зниженням величини цих показників на 10—15-ту добу розвитку інфекції. Протягом усього цього періоду мали місце цитодеструктивні процеси, причому на 15-ту добу інфекції кількість життєздатних клітин суттєво знизувалася (рис. 1, в).

ЕФР та ТФР- β слабо впливають на рівень вірусного білка p24 (див. рис. 1, а) та синцитієутворення (рис. 1, б) на стадії активної репродукції ВІЛ (5-та доба інфекції). Проте на 15-ту добу експерименту спостерігається тенденція до сповільнення зниження величини цитопатичних показників в інфікованих клітинах, які піддавалися дії ТФР. Необхідно також відзначити, що у присутності ТФР, особливо ТФР- β , призупиняється відмирання клітин, інфікованих ВІЛ (рис. 1, в).

З даних, наведених на рис. 2, видно, що Т-лімфобластоїдні клітини лінії MT-4/ІІВ (модель хронічної інфекції) характеризуються хвилеподібним розвитком інфекції з максимальним рівнем експресії вірусного антигена p24 (рис. 2, а) та

Ефективність лікування лафероном у комплексі з проспідіном хворих на саркому Капоші

Хворий	Кількість лікувальних курсів	Тривалість лікування, місяці	Регресія пухлин, %	Рівень трансформуючої активності у сироватці крові*		Зниження рівня трансформуючої активності у сироватці крові, %
				до лікування	після лікування	
1	6	3,2	100	496±25	323±40	34
2	6	13,5	100	697±11	398±44	43
3	6	7,5	90	907±43	503±98	45
4	6	3,3	Стабілізація патологічного процесу	803±71	303±33	62

* Кількість колоній клітин, що індукуються тестованою сироваткою крові в 40 мм чашці Петрі.

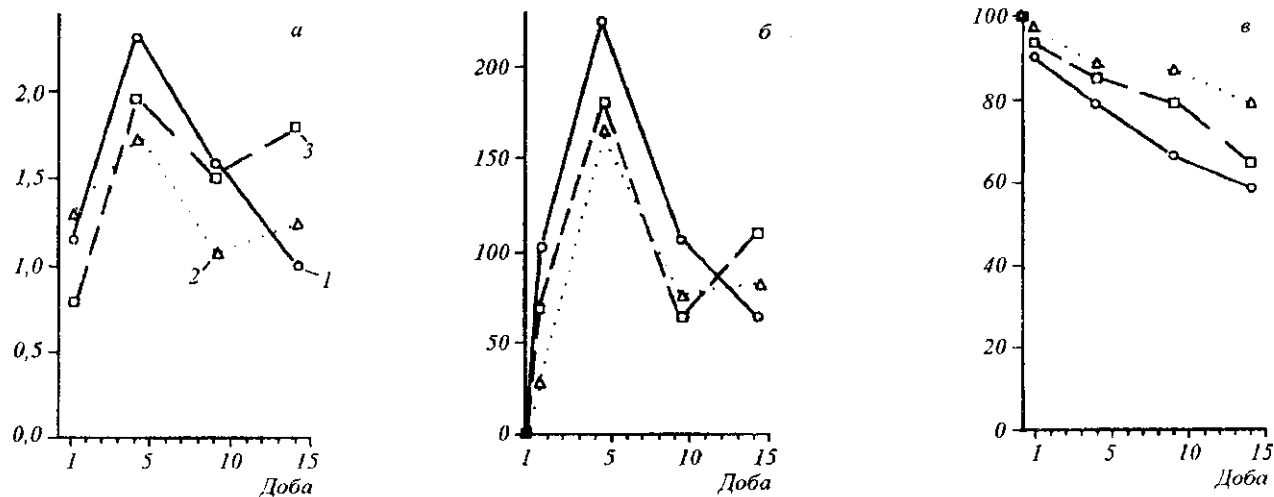


Рис. 1. Вплив ТФР на цитопатичний ефект та на репродукцію ВІЛ у клітинній моделі гострої вірусної інфекції (Т-лімфобластоїдна лінія клітин людини, інфікована ВІЛ-1, штам BRU): а — рівень експресії вірусного антигена р24 (по осі ординат — умовні одиниці (оптичне поглинання при 450 нм)); б — інтенсивність синцитієутворення (по осі ординат — кількість синцитіїв на 1000 клітин); в — цитопатичний ефект (по осі ординат — % живих клітин); 1 — контроль; 2 — ТФР- β (10 нг/мл); 3 — ЕФР (10 нг/мл)

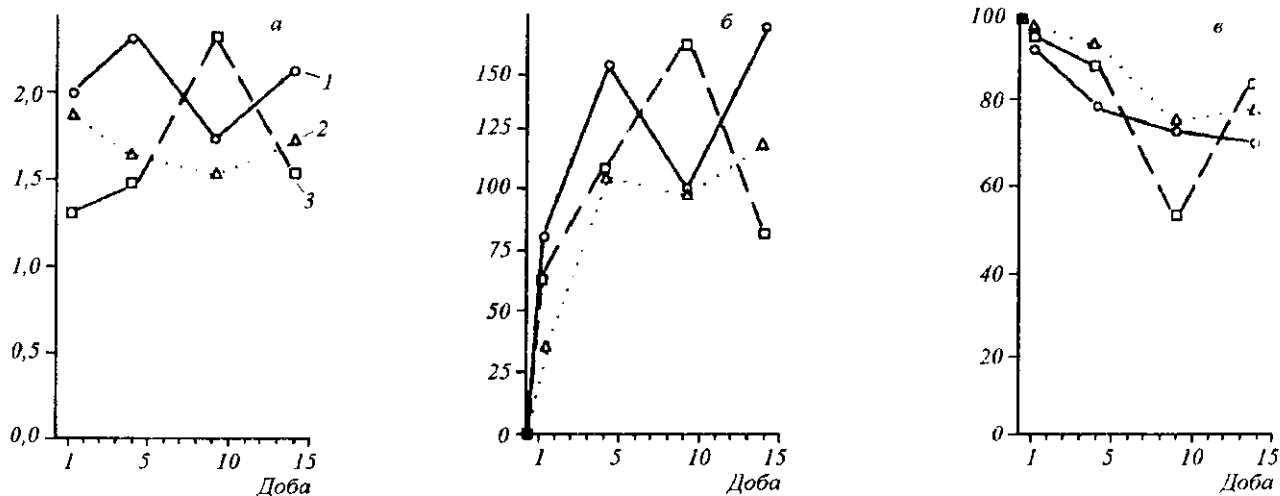


Рис. 2. Вплив ТФР на цитопатичний ефект та репродукцію ВІЛ у клітинній моделі хронічної вірусної інфекції (Т-лімфобластоїдна лінія клітин людини, інфікована ВІЛ-1, штам ШВ). Позначення, як на рис. 1

утворення клітинних синцитіїв (рис. 2, б) на 5-ту і 15-ту доби інфікування клітин ВІЛ. Одночасно спостерігається повільніше, ніж при гострій інфекції, зменшення кількості життєздатних клітин. На 15-ту добу інфекції кількість живих клітин становить приблизно 68 % (рис. 2, в).

Впливи ЕФР та ТФР- β у клітинній моделі хронічної інфекції ВІЛ (див. рис. 2) не були такими однозначними, як у клітинній моделі гострої інфекції ВІЛ (див. рис. 1). Так, ЕФР підсилював дію ВІЛ на рівень вірусного антигена р24 (рис. 2, а) та утворення клітинних синцитіїв (рис. 2, б) на 10-ту

добу інфікування клітин. Проте на 1—5-ту добу та 15-ту добу інфікування клітин ефект ЕФР на експресію антигена p24, навпаки, був інгібуючим (рис. 2, а). Крім того, цей фактор росту пригнічував утворення клітинних синцитіїв на 15-ту добу інфікування (рис. 2, б). Що стосується ТФР- β , то він не так суттєво впливав на цитопатичний ефект ВІЛ у випадку моделі хронічної інфекції (див. рис. 2).

Наведені вище дані щодо особливостей біологічної дії ЕФР та ТФР- β у клітинних моделях гострої та хронічної інфекції ВІЛ становлять інтерес для вірусології СНІДу. Остаточне з'ясування молекулярних механізмів цієї дії вимагає проведення додаткових досліджень. Проте вже зараз можна вважати, що за умов гострої інфекції експресія ТФР посилює негативний вплив ВІЛ в організмі, тоді як за умов хронічної інфекції вплив ТФР суттєво залежить від фази розвитку інфекції.

Робота підтримувалася грантом N93/30 Національного Комітету по боротьбі з захворюванням на СНІД при Президентові України.

Р. С. Стойка, И. А. Якимович, С. В. Антоненко,
О. В. Барбашева, А. Л. Воронцова, Ю. И. Кудрявец,
А. А. Фильченков

Исследование роли трансформирующих факторов роста у больных СПИДом и саркомой Капоши

Резюме

Ранее мы обнаружили, что трансформирующая активность факторов роста в сыворотке крови больных СПИДом и саркомой Капоши значительно выше, чем в сыворотке крови здоровых доноров. Эту активность оценивали по способности сывороток индуцировать субстратнезависимый рост нормальных мышечных фибробластов линии NIH-3T3 в полужидкой среде, содержащей 0,33 % агара. В данной работе показано, что лечение больных саркомой Капоши лафероном (рекомбинантный $\alpha 2b$ -интерферон) сопровождалось значительным снижением уровня трансформирующей активности в сыворотке крови, положительно коррелировавшим с существенным улучшением состояния их здоровья. Для изучения роли трансформирующих факторов роста в модулировании цитопатического эффекта инфекции ВИЧ была использована MT-4-линия T-лимфобластоподобных клеток, инфицированных либо BRU-штаммом ВИЧ-1 (модель острой литической инфекции), либо HIV-штаммом этого вируса (модель хронической инфекции). Цитопатические эффекты ВИЧ определяли, подсчитывая процент мертвых клеток и количество клеточных синцитиев. Кроме того, определяли содержание вирусного белка p24. Показано, что трансформирующий фактор роста β и/или эпидермальный фактор роста (аналог трансформирующего фактора роста α) усиливали отрицательные влияния ВИЧ-1 в экспериментальной модели острой инфекции. Действие этих факторов не было столь однозначным при анализе результатов исследования клеточной модели хронической инфекции. Таким образом, ВИЧ-инфекция сопровождается увеличением трансформирующей активности факторов роста в сыворотке крови больных СПИДом, что может вызывать цитопатические эффекты, наблюдаемые у больных СПИДом.

R. S. Stoika, I. A. Yakymovych, S. V. Antonenko,
O. V. Barbasheva, A. L. Vorontsova, Yu. I. Kudryavets,
A. A. Phylchenkov

Study of transforming growth factors role in AIDS and Kaposi's sarcoma patients

Summary

Earlier we found that the transforming activity of growth factors in blood serum of AIDS and Kaposi's sarcoma patients was considerably higher than that in healthy donors' blood serum. This activity was estimated by studying the ability of serum to induce anchorage-independent growth of NIH-3T3 mouse fibroblasts in the semisolid culture medium supplemented with 0.33 % agar. Here we showed that the treatment of Kaposi's sarcoma patients with laferon (recombinant $\alpha 2b$ -interferon) caused a significant decrease in the level of transforming activity in blood serum of all treated patients and this decrease positively correlated with a substantial improvement of their health state. Two cellular models were used for the study of the role of transforming growth factors in the modulation of cytopathogenic effects of HIV-1 infection - MT-4 line of T-lymphoblastoid cells infected with BRU strain of HIV-1 (model of acute litycal infection) and the same cells infected with HIV virus strain (model of chronic infection). Cytopathogenic virus effects were estimated by counting the part of dead cells and the number of giant cells. The amount of p24 virus protein was also determined. It was found that transforming growth factor beta and/or epidermal growth factor (transforming growth factor alpha analogue) increased the negative HIV-1 effects in the experimental model of acute infection. The action of these cytokines was not so uniform in the case when the cellular model of chronic infection was use in the study. Thus, HIV-1 infection is accompanied by the increased transforming activity of growth factors in blood serum of AIDS and Kaposi's sarcoma patients and these growth factors could be responsible for cytopathogenic effects observed in AIDS patients. This could partially explain why the successful treatment of Kaposi's sarcoma patients with $\alpha 2b$ -interferon is accompanied by an decrease of the transforming growth factors activity in blood serum of the treated patients.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кусень С. Й., Стойка Р. С. Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста.—М.: Наука, 1985.—236 с.
2. Goustein A. S., Leof E. B., Shipley G. D., Moses H. L. Growth factors and cancer // Cancer Res.—1986.—43.—P. 1015—1029.
3. Lazdis J. K., Klimkait T., Woods-Cook K. et al. In vitro effect of transforming growth factor β on progression of HIV-1 infection in primary mononuclear phagocytes // J. Immunol.—1991.—147.—P. 1—14.
4. Kim S.-J., Kehrl J. H., Burton J. et al. Transactivation of the transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) gene by human T lymphotropic virus type 1 tax: A potential mechanism increased production of TGF- $\beta 1$ in adult T cell leukemia // J. Exp. Med.—1990.—172.—P. 121—129.
5. Sasaki H., Pollard R. B., Schmitt D., Suzuki F. Transforming growth factor- β in the regulation of the immune response // Clin. Immunol. and Immunopathol.—1992.—65, N 1.—P. 1—9.
6. Roth W. K., Brandstetter H., Sturzi M. Cellular and molecular features of HIV-associated Kaposi's sarcoma // AIDS.—1992.—6.—P. 895—913.
7. Фильченков А. А., Иващенко Ю. Д., Кулик Г. А.

- Получение эпидермального фактора роста с помощью гидрофобной хроматографии // Эксперим. онкология.—1991.—13, № 5.—С. 71—74.
8. Стойка Р. С., Сушельницкий С. И., Кусень С. И. Влияние трансформирующего фактора роста β , эпидермального фактора роста и инсулина на биосинтез ДНК в мышинных фибробластах линии Swiss-3T3 при низкой и высокой плотности клеток в монослойной культуре // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 4.—С. 39—43.
 9. Stoika R. S., Yakimovych I. A., Antonenko S. V. et al. Transforming activity of growth factors in blood serum of AIDS and Kaposi's sarcoma patients // Exp. Oncol.—1995.—17.—Р. 3—9.
 10. Коровин С. И., Воронцова А. Л., Толстопятов Б. А. и др. Лаферон как эффективное средство в лечении саркомы Капоши // Лаферон в лікуванні онкологічних та інфекційних захворювань.—Рівне, 1996.—С. 74—77.
 11. Фильченков А. А., Стойка Р. С., Быкорез А. И. Трансформирующие факторы роста.—Киев: Наук. думка, 1994.—292 с.
 12. Roberts A. B., Sporn M. B. Transforming growth factors // Cancer Surveys.—1985.—4, N 4.—Р. 683—705.
 13. Стойка Р. С., Кусень С. И. Трансформирующие факторы роста // Успехи соврем. биологии.—1988.—106, № 1(4).—С. 69—84.
 14. Сушельницкий С. И., Стойка Р. С., Гарасько С. И. и др. Влияние трансформирующего фактора роста β -типа и его комбинаций с эпидермальным фактором роста и инсулином на субстратнезависимую пролиферацию нормальных и опухолевых клеток // Цитология.—1989.—31, № 7.—С. 767—774.
 15. Phylchenkov A. A. Transforming growth factor α in oncology: current status and future prospects // Exp. Oncol.—1993.—15, N 4.—Р. 3—19.

Надійшла до редакції 26.06.96