



Биол. журн. Армении, 2 (62), 2010

## ВОЗДЕЙСТВИЕ дсРНК НА СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И МАРКЕРНОГО БЕЛКА В КЛЕТКАХ *HELa* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Յ.Բ. СЕМЕРДЖЯН, Օ.Տ. ЗАКАРЯН, Н.Վ. РАМАЗЯН, Г.Ր. АВАГЯН

*Институт молекулярной биологии НАН РА*

Методами цитофотометрии и цитоморфометрии исследовали физиологические показатели поведения клеток карциномы шейки матки человека (*HeLa*) в процессе культивирования до и после введения в среду двуспиральной РНК.

Под действием дсРНК повышается содержание ДНК в ядрах и ядрышках клеток, полностью исчезают диплоидные клетки, увеличивается число тетраплоидных и появляются октаплоидные клетки. Повышается содержание РНК в ядрышках и цитоплазме клеток. Возрастает среднее количество ядрышек на ядро. Полученные данные объясняются блоком клеток в фазе G2. Процент анеуплоидных клеток снижается с 85 до 64.

С увеличением времени инкубации синтез маркерного для клеток *HeLa* васкулярного эндотелиального ростового фактора (VEGF) в популяции клеток возрастает, а при действии дсРНК в течение 24 ч его синтез в клетках значительно снижается. Затем происходит восстановление уровня VEGF до контрольных значений, что объясняется кратковременным эффектом воздействия дсРНК.

*Двухспиральная РНК – культура клеток HeLa – ядро – ядрышко –  
ДНК – РНК*

Ցիտոֆոտոմետրիայի և ցիտոմորֆոմետրիայի մեթոդներով ուսումնասիրվել է մարդու արգանդի վզիկի բջիջների (*HeLa*) վարքագծի ֆիզիոլոգիական ցուցանիշները կուլտիվացիայի ընթացքում միջավայրի մեջ երկպարույր ՌՆԹ-ի ներմուծման և առանց վերջինիս ազդեցության պայմաններում:

Երկպարույր ՌՆԹ-ի ազդեցության տակ աճում է ԴՆԹ-ի քանակը բջջի կորիզներում, ամբողջովին անհետանում են դիպլոիդ բջիջները, ավելանում է տրիպլոիդների քանակը և ի հայտ են գալիս օկտապլոիդ բջիջներ: Ավելանում է նաև բջջի ցիտոպլազմայում և կորիզակներում ՌՆԹ-ի քանակը և կորիզում՝ կորիզակների միջին թիվը: Ստացված տվյալները բացատրվում են G2 փուլում բջիջների արգելակմամբ: Անետապլոիդ բջիջների տոկոսն իջնում է 85 մինչև 64: Բջջիջների կուլտիվացման ընթացքում VEGF-ի սինթեզը բջիջների պոպուլյացիայում աճում է, իսկ երկպարույր ՌՆԹ-ի ազդեցությունից 24 ժամվա ընթացքում այն նկատելիորեն նվազում է: Այնուհետև կատարվում է VEGF-ի մակարդակի վերականգնում, ինչը բացատրվում է երկպարույր ՌՆԹ-ի կարճաժամկետ ազդեցությամբ:

*Երկպարույր ՌՆԹ - բջջային կուլտուրա HeLa - կորիզ - կորիզակ - ԴՆԹ, ՌՆԹ*

The biological behavior of human transformed *Hela* cells and their nuclei and nucleoli under the influence of double-stranded low molecular RNA during cultivation were studied by methods of cytomorphometry and cytophotometry. The synthesis of vascular endothelial growth factor (VEGF) by *HeLa* cells were investigated as well.

Under the action of dsRNA increases the total DNA content of HeLa cells, diploid population disappears, 4 «c» population increases, appears 8c cells. The obtained results shown that dsRNA cause G2-block of HeLa cells and develop polyploid cells. During the cultivation period increases the VEGF synthesis. The influence of double-stranded RNA synthesis VEGF in cells decreased within 24 hours. Then occurs the restoration of the VEGF level to its level in control, which is explained with a short-time effect of the influence dsRNA.

*Double-stranded RNA - cell line HeLa – nucleus – nucleolus – DNA - RNA*

Двуспиральные рибонуклеиновые кислоты (дсРНК) являются биологически активными соединениями, обладающими широким спектром активности [2]. Ранее было показано, что Na-дсРНК и Ca-дсРНК обладают ингибирующими рост клеток свойствами [3,4].

Биологические эффекты дсРНК могут быть как результатом действия индуцированного эндогенного интерферона (ИФН), так и прямого воздействия дсРНК в зависимости от того, на каких культурах (ИФН-резистентных или нет) проводятся эксперименты. Линия HeLa является одной из первых постоянных клеточных линий человека. Она была выведена из клеток карциномы шейки матки. Известно, что клетки линии HeLa не способны производить интерферон (ИФН) [6], вследствие чего дсРНК не оказывает на них ИФН-опосредованного действия.

Васкулярный эндотелиальный ростовой фактор (VEGF) является известным стимулятором пролиферации для клеток эпителиального происхождения [7,8].

Целью работы было выявление воздействия дсРНК на содержание ДНК и РНК в клетках HeLa, изменение классов плоидности клеток и динамику синтеза маркерного для данной культуры белка – VEGF.

**Материал и методика.** *Клетки.* Клетки HeLa культивировались на покровных стеклах в среде Игл-DMEM с добавлением глутамина и 10%-ной фетальной бычьей сыворотки.

*Определение VEGF в надосадочных пробах клеток HeLa.* Антитела IgG к VEGF в надосадочной жидкости клеток HeLa определяли набором фирмы Diaclone Research методом ELISA, основанном на классической твердофазной иммуоферментной технике.

*дсРНК.* В качестве источника дсРНК использовали ларифан (Na<sup>+</sup>-дс-РНК) в дозе 16 мг/мл, который производится в Латвии в Институте микробиологии и был предоставлен др. Г. Фелдмане. Он получен из биомассы *Escherichia coli*, инфицированными амбермутантным фагом f2.

*Цитофотометрия.* Все препараты фиксировали в 96 %-ном этиловом спирте в течение 30 мин и окрашивали фуксином по Фельгену [5] Количественное определение комплекса ДНК-фуксин, площади и периметра ядра и каждого из ядрышек в отдельности и суммарно проводили при длине волны 575 нм на цитоспектрофотометре SMP 05 фирмы ОРТОН теле-визионным методом с оконтуриванием ядра и каждого из ядрышек в отдельности. В качестве эталона ДНК использовали лимфоциты доноров, на их основе выявляли распределение клеток культуры по плоидности (%) и определяли соотношение эу- и анеуплоидных клеток, среднее число яд-рышек в ядрах в %.

Содержание РНК в ядрышках и цитоплазме определяли после окраски препаратов галлоцианин-хромовыми квасцами по методу Зандриттера [1] с последующей фотометрией препаратов при длине волны в 610 нм тем же методом.

Достоверность различий средних значений оценивали по критерию Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Выявлено, что в цитоплазме и ядрышках контрольной популяции клеток HeLa содержание РНК достоверно меньше, чем при воздействии дсРНК. Увеличение количества РНК в опыте происходит одновременно с увеличением площади цитоплазмы и достоверным увеличением среднего числа ядрышек на ядро, но при неизменной суммарной площади ядрышек.

Содержание РНК в цитоплазме, ядрышке и число ядрышек в ядре в среднем увеличивается на 20-25 % (табл. 1).

**Таблица 1.** Основные транскрипционные показатели клеток HeLa в норме и под действием дсРНК

Показатели	HeLa контроль 48 ч		HeLa + дсРНК	
	Цитоплазма	Ядрышко	Цитоплазма	Ядрышко
РНК (x±σ <sub>x</sub> )	255.7±6.7	28.9±1.3	305.2±8.7*	37.2±1.7*
Площадь (y.e)	144.8±4.8	8.9±0.4	199.4±6.0*	8.9±0.3
Среднее число ядрышек	-	2.3±0.15	-	3.0±0.16*

\* p < 0.01 по сравнению с контролем

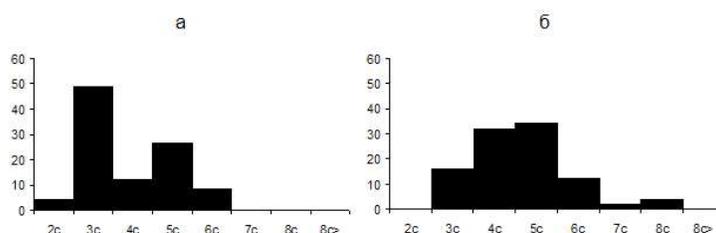
**Таблица 2.** Динамика содержания ДНК (с), площадь и периметр ядер и ядрышек клеток HeLa в контроле и при воздействии на нее дсРНК

Группы	Срок культивирования, ч	Ядро			Ядрышко		
		ДНК (с)	Площадь, у.е.	Периметр, у.е.	ДНК, у.е.	Площадь, у.е.	Периметр, у.е.
Контроль	48	3,8±0,2*	77.9±1.8	21.0±0.3	8.7±0.5*	6.3±0.2	6.8±0.3
дсРНК	24+24	4,6±0,2*	80.1±2.0	21.0±0.5	11.7±0.5*	6.7±0.3	7.2±0.4

\* p < 0.001 по сравнению с контролем

Как видно из табл. 2, содержание ДНК в ядрах клеток HeLa при действии дсРНК увеличивается более чем на 20%, в то время как площадь и периметр ядер меняются незначительно. Такая же тенденция сохраняется и в ядрышках.

Как видно из рис 1 (а,б), в контрольной популяции клеток HeLa, которая в целом околотетраплоидная (3,8с), преобладают анеуплоидные клетки в районе 3с и 5с ДНК.



**Рис. 1.** Распределение ядер клеток культуры HeLa по плоидности в контроле (а) и при действии дсРНК (б)

Небольшая популяция диплоидных клеток составляет менее 5%. При действии дсРНК полиплоидия в клетках HeLa значительно увеличивается. Процент триплоидных клеток в контроле составляет около 50, в опыте их число уменьшается более чем вдвое. Увеличивается содержание тетраплоидных клеток, что, вероятнее всего, связано не с анеуплоидией, а с прохождением клетками S – фазы или задержкой их в G<sub>2</sub> – фазе митотического цикла.

Из рис. 1 видно, что гистограмма смещается вправо, что свидетельствует о повышенном накоплении ДНК (культура становится гипертетраплоидной – 4,6 с), исчезает диплоидная и увеличивается тетраплоидная популяции, появляются октаплоидные клетки. Процент анеуплоидных клеток снижается с 85 до 64.

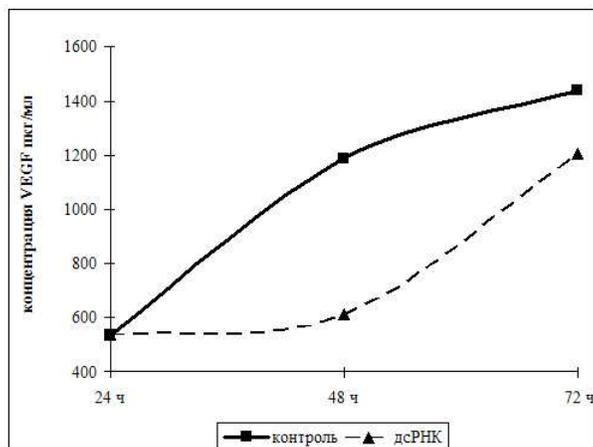


Рис. 2. Изменение содержания VEGF при действии дсРНК

Из рис. 2 видно, что в контроле концентрация VEGF в начале наблюдения составляла 537 пкг/мл, к 48 ч культивирования увеличилась до 1188 пкг/мл; к 72 ч она возрасла до 1440 пкг/мл. При действии дсРНК уровень VEGF в течение первых 24 ч по сравнению с исходным меняется незначительно, но ввиду того что дсРНК оказывает воздействие в течение ограниченного срока (около 24 ч) по окончании действия дсРНК содержание VEGF увеличивается до 1202 пкг/мл, что почти соответствует контролю.

Итак, под действием дсРНК транскрипционная активность клеток возрастает и к 24 ч от начала опыта содержание РНК в ядрышках и цитоплазме клеток достоверно выше, чем в контроле. Возрастает среднее количество ядрышек на ядро. Показано также увеличение содержания ДНК в ядрах клеток HeLa. Выявленное нами повышение транскрипционной активности клеток HeLa под действием дсРНК объясняется блоком клеток в фазе  $G_2$ . Подтверждением блокирования клеток в фазе  $G_2$  является возникновение 8с клеток, отсутствующих в контроле. Известно, что один из пиков наибольшей транскрипционной активности в условиях *in vitro* приходится на начальные этапы  $G_2$  фазы [11], вследствие чего возрастает среднее количество ядрышек.

Кратковременный эффект дсРНК в отношении синтеза VEGF объясняется быстрой инактивацией молекулы дсРНК с распадом на отдельные нуклеотиды. По данным литературы [9], период полураспада дсРНК в клетках HeLa составляет всего около 30-40 мин. После этого в течение нескольких часов проявляются физиоло-гические эффекты, вызванные дсРНК, а затем происходит восстановление клеточных показателей до контрольных значений. Согласно данным литературы [10], в условиях *in vitro* анеуплоидия клеток прямо коррелирует с повышенным синтезом VEGF, что, скорее всего, является причиной снижения синтеза VEGF.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Зандриттер В., Кифер Г., Рик В.* Галлоцианин-хромовые квасцы. В кн.: Введение в количественную цитохимию. М.; Мир. 240-264., 1969.
2. *Земсков В. М., Лидак М. Ю, Земсков А. М., Микстайс У. Я.* Низкомолекулярная РНК. Получение, гидролиз и применение в медицине. Рига. Зинатне, с.191.,1985.
3. *Каралова Е. М., Камалян Л. А., Аброян Л.О., Акопян Л. А., Гаспарян М. Г., Джагацпанян Н. Г., Каралян А., Тер-Погосян З. П., Магакян Ю. А.,* Цитология. 45, 8, 2003.
4. *Каралова Е. М., Камалян Л. А., Аброян Л.О., Акопян Л. А., Гаспарян М. Г., Джагацпанян Н. Г., Каралян А., Тер-Погосян З. П., Магакян Ю.А.* Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 137, 6, 2004.
5. *Магакян Ю. А., Каралова Е. М.* Цитофотометрия ДНК., Ереван. Изд-во АН АрмССР, 204 с., 1989.
6. *Cantell K.* Archives of Virology.10, 4, 510-521,1961
7. *Ferrara N. and Davis-Smyth T.,* Endocrine Reviews.18, 1, 4-25, 1997.
8. *Ferrara N.* Journal of Molecular Medicine, 77, 7, 527-543, 1999.
9. *Dynamics H.* Degradation and Chemical Modification of Non-Coding RNA.University of Michigan .Doctor diss. 2008.
10. *Hunter J. A. C., Skelly R H., Aylwin S. J. B., Geddes J. F., Evanson J., Besser G. M., Monson J. P., Burrin J. M.* European Journal of Endocrinology.148, 203–211, 2003.
11. *Silvestrini R., Di Marco A. and Dasdia T.,* Cancer Research. 30, 966-973, 1970.

Поступила 04.09.2009.