



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(64), 2012

ՆԵՅՐՈՔԼԱՍՏՈՄԱՅԻՆ SK-N-MC ԲԶԶԱՅԻՆ ԳԾԻ ՊԼՈՒՌԴՈՒԹՅԱՆ ՑՈՒՑԱՆԻՇԻ ՈՒՄՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԱՐԴՈՒ ԶԵՐՊԵՍՎԻՐՈՒՍ-1 ՎԱՐԱԿԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Հ.Ս. ՉԱԶԱՐՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտ, բջիջ կենսաբանության լաբորատորիա
hovakim@yba.am

Ուսումնասիրվել են նեյրոբլաստոմային SK-N-MC բջիջների պլուրդության ցուցանիշի (c) փոփոխությունները մարդու հերպեսվիրուս 1 վարակի ժամանակ: Ցույց է տրվել, որ վարակից 24 ժ անց, ի հայտ են գալիս բջիջներ, որոնցում ԴՆԹ-ի քանակը գերազանցում է 64c: Նմանատիպ բջիջներում քրոմատինի կառուցվածքը խախտված է, իսկ կորիզակային մարմնիկները բացակայում են: Վարակի ավելի ուշ փուլերում նման բջիջներ չեն հայտնաբերվել:

Բջիջ – հերպեսվիրուս – կորիզ – պլուրդություն – սինցիտիում

Изучался показатель плоидности (c) нейробластомных клеток SK-N-MC при заражении человека герпесвирусом типа 1. В этой работе показано, что через 24 ч после заражения появляются клетки, в которых количество ДНК больше 64c. В таких клетках нарушена структура хроматина, а также отсутствуют ядрышки. На поздних стадиях инфекции таких клеток не было обнаружено.

Клетка – герпесвирус – ядро – плоидность – синцитий

We studied the ploidy index (c) of neuroblastoma cell line, SK-N-MC, during infection with human herpesvirus 1. Herein we show the emergence of cells in which DNA content exceeded 64c after post-infection 24 hours. These cells were characterized by the absence of nucleoli and disrupted chromatin structure. Cells with elevated DNA content were not detected in the later stages of infection.

Cell – herpesvirus – nucleus – ploidy – syncytium

Մարդու հերպեսվիրուս 1-ը (ՄՅՎ-1) պատկանում է Herpesviridae ընտանիքին, որի մեջ ներառված են լիպիդային թաղանթ ունեցող երկշղթա ԴՆԹ գենոմով մարդու և կենդանիների տարբեր վիրուսներ: Herpesviridae ընտանիքի մեջ մտնում են մարդու ութ տարբեր հերպեսվիրուսներ, այն է ՄՅՎ-1 և -2, Էպշտեյն-Բառի վիրուսը, Վարիցելազոստեր վիրուսը, մարդու ցիտոմեգալովիրուսը, Կապոշիի սարկոմայի ասոցացված հերպեսվիրուսը, ՄՅՎ-6 և -7: Մարդու հերպեսվիրուսները մարդկային պոպուլյացիայում հանդիպող ամենատարածված վիրուսներն են, որոնք կարող են սուր վարակի հետ մեկտեղ հարուցել նաև լատենտ վարակ և պահպանվել պոպուլյացիայում երկար ժամանակ:

ՄՅՎ-1 (ինչպես նաև ՄՅՎ-2) հարուցում են լորձաթաղանթի տեղային վնասվածքներ: Սուր վարակ առաջացնում են լորձաթաղանթի էպիթելիային բջիջներում իսկ նյարդային ծագման բջիջներում (սենսորային նեյրոններում)՝ հիմնականում լատենտ վարակ: Լատենտ վարակի ժամանակ ՄՅՎ-1 գենոմը հանդես է գալիս որպես օղակաձև էպիսոմ, որի գեների մեծ մասը լուծված վիճակում են և վիրուսը չի ռեպլիկացվում: Տարբեր սթրեսային գործոնների ազդեցությամբ՝ հյուսվածքների վնասվածք, հիպերթերմիա, հորմոնալ խանգարում և այլն, ՄՅՎ-1 ակտիվանում է և սկսում ռեպլիկացվել սենսորային նեյրոններում [16]:

Կորիզում, ինչպես նաև ցիտոպլազմայում, ռեպլիկացվող վիրուսների մեծ մասը հարուցում են կորիզային կառուցվածքների և գործառնությունների ձևափոխում [17]: Ցույց է տրվել, որ ՄՅՎ-1 ձևափոխում է կորիզի այնպիսի կառուցվածքներ, ինչպես օրինակ պրոմիլեոցիտիկ լեյկեմիայի մարմնիկները, կորիզաթաղանթը և կորիզակները [7, 10, 12]: ՄՅՎ-1 կարող է առաջացնել նաև գենետիկական անկայունություն: ՄՅՎ-1 վարակի ժամանակ գենետիկական անկայունությունը առաջացման մի քանի եղանակներ են հայտնի՝ սինցիտիումների ձևավորում, քրոմոսոմային կտրվածքներ և բջիջ բաժանման խանգարում [6, 13, 15]:

Պոլիպլոիդությունը գենետիկական անկայունության մեկ այլ տարածված ձև է, որի ժամանակ տեղի է ունենում քրոմոսոմային հավաքակազմի փոփոխություն: Ցույց է տրվել, որ մի շարք վիրուսներ, այդ թվում և ՄՅՎ-1, կարող են խափանել բջիջ բաժանման շրջանը և առաջացնել պոլիպլոիդիա [6, 9]: ՄՅՎ-1 վարակի ժամանակ պոլիպլոիդ բջիջների առաջացման եղանակները վատ են ուսումնասիրված, իսկ պոլիպլոիդիան նյարդային ծագման բջիջներում մնում է չհետազոտված:

Այս աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել նեյրոբլաստոմային SK-N-MC բջջային գծի պոլիպլոիդության ցուցանիշը ՄՅՎ-1 վարակի տարբեր ժամանակահատվածներում: Այդ նպատակով հաշվարկվել է վարակված բջիջների ԴՆԹ-ի քանակը և բջիջները դասակարգվել են ըստ պոլիպլոիդության դասերի: Աշխատանքում ներկայացվում են նաև բջիջների պոպուլյացիոն ցուցանիշները վարակի ժամանակ:

Նյութ և մեթոդ: *Բջիջներ.* SK-N-MC բջջային գծից նեյրոբլաստոմային ծագում ունի: Այն աճեցվել է Eagle DMEM միջավայրում՝ ցուլի սաղմնային 10%-ոց շիճուկի ավելացմամբ: Բջիջների ցանքի չափաբաժինն է՝ 2×10^5 բջիջ/մլ:

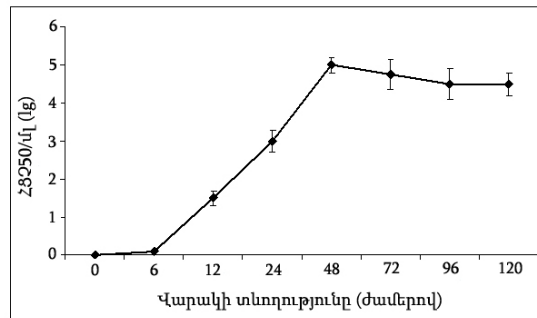
Վիրուս. Աշխատանքում օգտագործվել է ՄՅՎ-1: Վարակի առաջացման համար բջիջներին 24 ժամյա մոնոշերտին (ծածկապակի) ավելացվել է 0.0001 ՅՑՉ50 (հյուսվածքային ցիտոպաթիկ չափաբաժին)/բջիջ քանակի վիրուս: Վիրուսի կենսաբանական տիտրը վարակի տարբեր ժամանակահատվածներում որոշվել է Կերբերի մեթոդով [4]:

Բջջաֆոտոմետրիա. Բջջաբանական և բջջագենետիկ հետազոտությունների նպատակով վերցված ծածկապակիների ստուգիչ և վիրուսով վարակված խմբերը դիտարկվել են մինչև վարակի 120-րդ ժամը: Բջջաֆոտոմետրիայի նպատակով բջիջները 30 րոպե պահվել են 96° Էթիլ սպիրտի մեջ, որից հետո ներկվել են հիմնային ֆլուբսինով՝ ըստ Ֆյուգենի: ԴՆԹ-ի հիդրոլիզը կատարվել է 5N HCl մեջ (1 ժ, 22°C) ապա ներկվել Շիֆի ռեակտիվով՝ ըստ Սթեյնի մոդիֆիկացիայի [1]: ԴՆԹ-ի քանակի հաշվարկման համար յուրաքանչյուր բջիջ կորիզը ընդգծվել է Bioscan ծրագրով ապա հաշվարկվել SMP 05 (Opton) բջջաֆոտոմետրով՝ 575 նմ ալիքի համար: Աշխատանքում ԴՆԹ-ի քանակը արտահայտված է c միավորով, և 1c համարժեք է բջիջի հապլոիդ քրոմոսոմային հավաքակազմի ԴՆԹ-ի քանակին [5]: Որպես դիպլոիդ չափանիշ վերցվել է մարդու լիմֆոցիտների ԴՆԹ-ի քանակը [1]:

Վիճակագրական հաշվարկ. Փորձը կրկնվել է երեք անգամ: Յուրաքանչյուր փորձի համար հաշվարկվել է 100 բջջակորիզներում եղած ԴՆԹ: Միջին մեծությունների տարբերության հավաստիությունը գնահատվել է Սթյուդենտի t-թեստի մեոցով, $p < 0.05$ մակարդակն ընդունվել է որպես հավաստի:

Արդյունքներ և քննարկում: Վիրուսի ռեպլիկացիան SK-N-MC բջիջներում ընթացել է դանդաղ համեմատած ավելի զգայուն բջջային գծերի հետ, ինչպես օրինակ Vero: Վիրուսի տիտրի առավելագույն արժեքը՝ $4.5-5.0 \times 10^5$ /մլ, գրանցվել է վարակից 48 ժ անց, որից հետո նկատվել է տիտրի նվազում, պայմանավորված բջիջների միաշերտի քայքայմամբ (նկ. 1): Բջիջների պոպուլյացիոն ցուցանիշների ուսումնասիրությունը ցույց է տալիս, որ վարակի սկզբնական շրջանում բջիջների քանակը արժանահավատ փոփոխության չի ենթարկվում և միայն վարակի 72-րդ ժամից սկսած նկատվում է բջիջների քանակի նվազում միավոր մակերեսում (աղ. 1): Վարակի բոլոր ժամանակահատվածներում նկատվում է մահացած բջիջների քանակի արժանահավատ աճ: Մահացած բջիջների առավելագույն քանակը գրանցվել է վարակի 72-96 ժ ժամանակահատվածում: Բջիջների միտոտիկ ակտիվության փոփոխություն չի նկատվում:

Բջջաֆոտոմետրիկ տվյալների համաձայն SK-N-MC բջիջները ստուգիչ խումբը շուրջապոլիպլոիդ են և պոլիպլոիդ բջիջների (8c և ավել) քանակը կազմում է $6.7 \pm 0.6\%$ (նկ. 2): Բջիջների աճեցման ժամանակ պոլիպլոիդ բջիջների տոկոսի փոփոխություն գրեթե չի նկատվել, և միայն 120-րդ ժամից սկսած նկատվում է քանակի նվազում ստուգիչում ապա նաև վարակված բջիջների խմբում (144-րդ ժամին): Այսպիսով, պոլիպլոիդ բջիջները պահպանվում են ամբողջ փորձի ընթացքում:



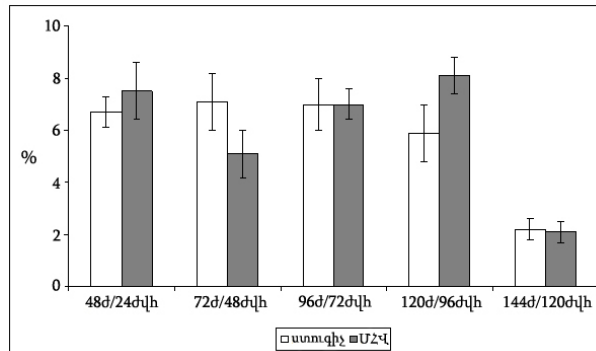
Նկար 1. SK-N-MC բջիջներում ՄՅՎ-1 տիտրի փոփոխությունը վարակի տարբեր ժամերին

Աղյուսակ 1. SK-N-MC բջիջների պոպուլյացիոն ցուցանիշները

Խումբ և ժամ	Բջիջների քանակը, 0.01 մմ ²	Միտոզների քանակը, %	Մահացած բջիջների քանակը, %
Ստուգիչ 24+24 ժ	17.8±0.9	2.3±0.3	6.9±2.3
ՄՅՎ-1 24+24 ժ	17.4±0.9	3.1±0.2*	14.1±1.6*
Ստուգիչ 24+48 ժ	18.2±0.7	2.2±0.4	8.2±1.1
ՄՅՎ-1 24+48 ժ	20.3±0.9	2.5±0.4	17.7±1.5*
Ստուգիչ 24+72 ժ	20.1±0.9	2.3±0.3	15.0±1.4
ՄՅՎ-1 24+72 ժ	15.8±0.7*	2.0±0.5	22.2±2.6*
Ստուգիչ 24+96 ժ	19.3±0.8	2.1±0.3	11.4±1.6
ՄՅՎ-1 24+96 ժ	13.5±0.8*	2.2±0.4	27.4±2.2*

* $p < 0,05$

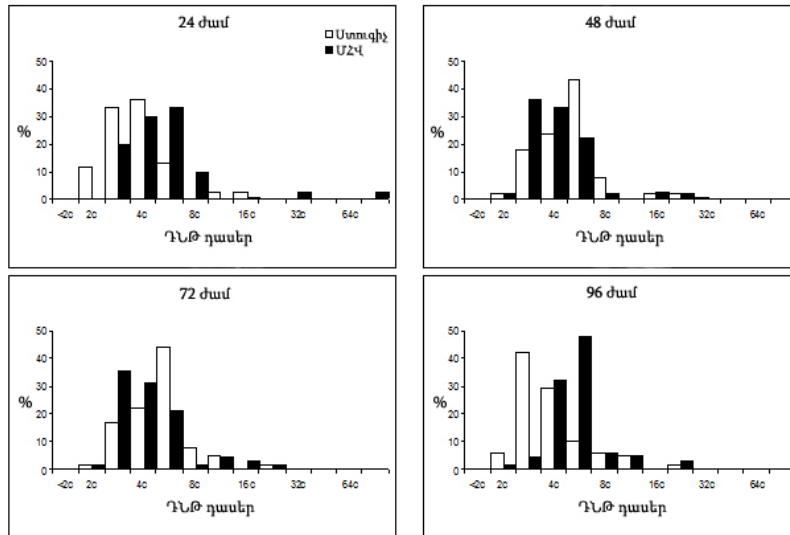
Ստուգիչ խմբի պոլիպլոիդ բջիջներում ՂՆԹ-ի քանակը հիմնականում համապատասխանում է 8c-16c արժեքներին և 32c պոլիպլոիդ բջիջներ չեն հանդիպում (նկ. 3): Հիստոգրամայից երևում է, որ բջիջների աճեցման սկզբնական շրջանում ավելանում են գերտետրապլոիդ բջիջները, իսկ ավելի ուշ փուլերում մահացած բջիջների թվաքանակի ավելացմանը զուգահեռ, հիստոգրաման տեղաշարժվում է ձախ, և գերակշռում են հիպերդիպլոիդ բջիջները (նկ. 3):



Նկար 2. Պոլիպլոիդ բջիջների տոկոսային քանակը Աբգիսների առանցքի իրենից ներկայացնում է տարբեր ժամանակահատվածներ, որի վրա ժ-ն նշանակում է ժամ (բջիջների աճեցման տևողությունը) իսկ ժվ-ն՝ ժամ վարակից հետո (վիրուսային վարակի տևողությունը)

Վիրուսային վարակից 24 ժ անց ի հայտ են գալիս մեծ պոլիպլոիդ բջիջներ, որոնցում ՂՆԹ-ի քանակը գերազանցում է 32c: Նման բջիջներում ՂՆԹ-ի քանակը հասնում է մինչև 64c և ավել (նկ. 3): Մեծ պոլիպլոիդ բջիջների կյանքի տևողությունը կարճ է և վարակից 48 ժ անց բջիջները անհետանում են: Վարակի ավելի ուշ փուլերում (96-120 ժ և ավել) կրկին ի հայտ են գալիս մեծ պոլիպլոիդ բջիջներ (ցույց տրված չէ):

ԴՆԹ-ի քանակը պոլիպլոիդ բջիջներում վարակի ժամանակ ավելի մեծ է քան ստուգիչում: Եթե ստուգիչ խմբում ԴՆԹ-ի միջին քանակը 8c և ավել բջիջներում հավասար էր 12.6 ± 1.5 , ապա վարակից 24 ժ անց այն դառնում է 44.3 ± 4.1 ($p < 0.001$): Վարակի ավելի ուշ ժամերին արժանահավատ տարբերությունը վերանում է (ցույց տրված չէ):



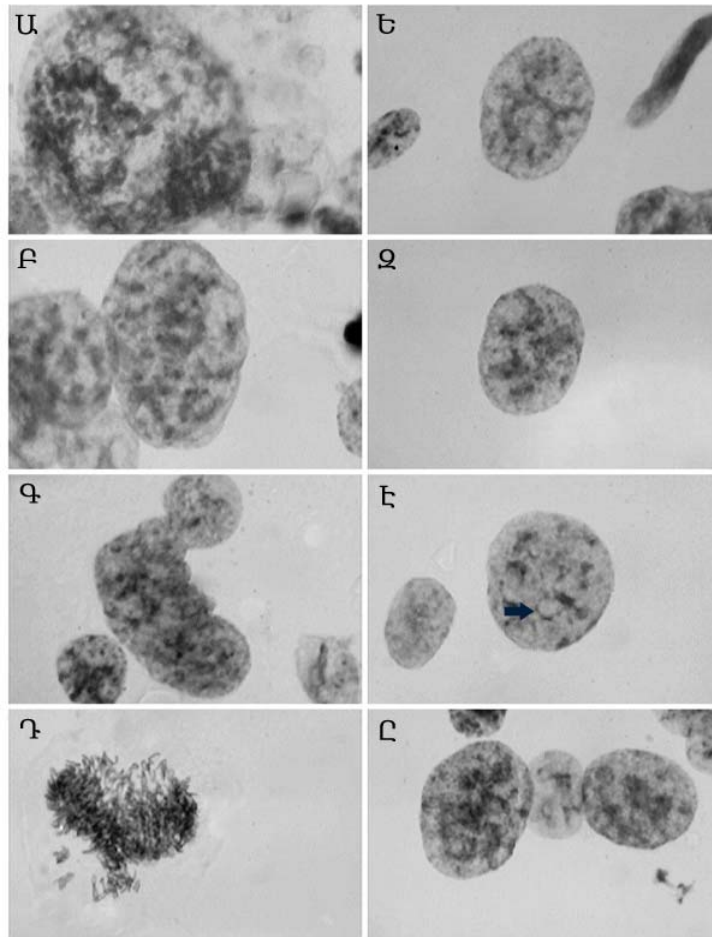
Նկար 3. SK-N-MC բջիջների տոկոսային բաշխումը ըստ պոլիպլոիդության դասերի

Դիտարկվող պոլիպլոիդ բջիջները կարելի է բաժանալ երկու խմբի՝ ըստ քրոմատինի և կորիզակների առկայության: Առաջին խմբի մեջ մտնում են այն բջիջները, որոնց կորիզում պահպանվել է քրոմատինի կառուցվածքը և երևում են կորիզակներ (նկ. 4 Բ, Ե, Զ, Ը): Նման բջիջներում ԴՆԹ-ի քանակը չի գերազանցում 32c: Երկրորդ խմբի մեջ մտնում են այն բջիջները, որոնցում քրոմատինի կառուցվածքը խանգարված է, իսկ կորիզակները բացակայում են (նկ. 4 Գ): Նմանատիպ բջիջների ԴՆԹ-ի քանակը հիմնականում գերազանցում է 32c, և նման բջիջներ կարող են առաջանալ մի քանի կորիզների միաձուլումից:

ՄՀՎ-1 վարակի ժամանակ պոլիպլոիդ բջիջների առաջացման մեխանիզմները վատ են ուսումնասիրված: Հայտնի է, որ պոլիպլոիդ բջիջների առաջացման հիմնական պատճառը միտոզի խափանումն է տարբեր փուլերում [11]: Ցույց է տրվել, որ ՄՀՎ-1 վարակի ժամանակ պոլիպլոիդ բջիջների առաջացման պատճառ կարող են հանդիսանալ վիրուսային չորս սպիտակուցներ՝ ICP4, ICP8, ԴՆԹ-պոլիմերազը և Նուկլեազը [2]: Միտոզի արգելափակում հատկապես կարող է առաջացնել ԴՆԹ-պոլիմերազը և վիրուսները, որոնք ջերմազգայուն մուտանտներ են ԴՆԹ-պոլիմերազի նկատմամբ, չորս անգամ ավելի քիչ պոլիպլոիդ բջիջներ են առաջացնում, քան վայրի տեսակի ՄՀՎ-1: Վերջին շրջանում նկարագրվել է վիրուսային մեկ այլ սպիտակուց՝ ICP0-ի դերը միտոզի խանգարման մեջ: Ցույց է տրվել, որ E3 ուբիքվիտինիզացային ակտիվություն ունեցող ICP0 սպիտակուցը կարող է առաջացնել միտոզի արգելափակում G2/M փուլում՝ p53-ից անկախ ճանապարհով [8]:

Հայտնի է նաև, որ ICP0 խթանում է ցենտրոսոմային կառուցվածքի քայքայումը և առաջացնում է անկայուն միկրոխողովակներ [3, 9]:

Այս աշխատանքում ցույց տրվեց, որ վարակից 24 ժ անց, առաջանում են հսկա կորիզով պոլիպլոիդ բջիջներ, որոնցում ԴՆԹ-ի քանակը գերազանցում 64c: Նմանատիպ հսկա կորիզներ շատ կարճ ժամանակահատվածում կարող են առաջանալ մի քանի կորիզների միաձուլման արդյունքում, այլ ոչ թե միտոզի խանգարման: Միտոզի խանգարմամբ առաջացող պոլիպլոիդ բջիջների ԴՆԹ-ն սովորաբար չի գերազանցում 32c և կորիզում պահպանվում է քրոմատինի կառուցվածքն ու կորիզակները:



Նկար 4. Պոլիպլոիդ բջիջների կորիզները վիրուսային վարակի (Ա-Դ) ժամանակ և ստուգիչ (Ե-Ը) խմբում

Ա - ոչ կենսունակ բջիջ մեծ կորիզ (վարակից 24 ժ անց), Բ - պոլիպլոիդ բջիջ կորիզ (վարակից 48 ժ անց), Գ - մի քանի կորիզների միաձուլում (վարակից 24 ժ անց), Դ - պոլիպլոիդ բջիջ միտոզ (վարակից 48 ժ անց), Ե, Զ - պոլիպլոիդ բջիջների կորիզներ, Է, Ը - շուրջօղակիդ և պոլիպլոիդ բջիջների կորիզներ: Բջիջ կորիզները ներկվել են Ֆլուգենի մեթոդով: Մանրադիտակի խոշորացումը՝ 1000 x:

Հայտնի է, որ շատ վիրուսներ, այդ թվում և ՄՅՎ-1, օրգանիզմում տեղաշարժվում են, օգտագործելով բջիջների միջև եղած կապերը: Արագ տեղաշարժման համար ՄՅՎ-1 առաջացնում է սինցիտիումներ, որոնք իրենցից ներկայացնում են բազմաթիվ բջիջների միաձուլում, պահպանված առանձին կորիզներով [14]: Սակայն մինչ այժմ նկարագրված չէ կորիզների միաձուլումը սինցիտիումների ներսում:

Ստացված տվյալների հիման վրա կարելի է ենթադրել, որ խոշոր կորիզով ու ԴՆԹ-ի 64c և ավել քանակով պոլիպլոիդ բջիջների առաջացումը սինցիտիումի ներսում կորիզների միաձուլման հետևանք է: Չնայած, որ այս երևույթը հերպեսվիրուսների դեպքում շատ վատ է ուսումնասիրված, ստացված արդյունքները լավ հիմք են հանդիսանում հետագա հետազոտությունների համար, որոնք կարող են լույս սփռել ՄՅՎ-1 բջջախտաբանության անհայտ կողմերի վրա:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Магакян Ю.А., Каралова Е.М.* Цитофотометрия ДНК. Ереван, Издательство АН Армении, 1989.
2. *Chenet-Monte C., Mohammad F., Celluzzi C.M., Schaffer P.A., Farber F.E.* Herpes simplex virus gene products involved in the induction of chromosomal aberrations. *Virus Res* 6, 3, 245-60, 1986.
3. *Everett R.D., Earnshaw W.C., Findlay J., Lomonte P.* Specific destruction of kinetochore protein CENP-C and disruption of cell division by herpes simplex virus immediate-early protein Vmw110. *EMBO J.*, 18, 1526-1538, 1999.
4. *Finney J.* Statistical Method in Biological Assay. Hafner Publishing Co., N.Y., 1952.
5. *Haroske G., Kunze K.D. and Theissig F.* Prognostic significance of image cytometry DNA parameters in tissue sections from breast and gastric cancers. *Anal Cell Pathol.*, 3, 11-24. 1991.
6. *Hobbs W.E., DeLuca N.A.* Perturbation of cell cycle progression and cellular gene expression as a function of herpes simplex virus ICP0. *J Virol.*, 73, 8245-8255, 1999.
7. *Lee C.P. Chen M.R.* Escape of herpesviruses from the nucleus. *Rev Med Virol.*, 20, 214-230, 2010.
8. *Li H., Baskaran R., Krisky D.M., Bein K., Grandi P., Cohen J.B., Glorioso J.C.* Chk2 is required for HSV-1 ICP0-mediated G2/M arrest and enhancement of virus growth. *Virology* 375, 13-23, 2008.
9. *Liu M., Schmidt E.E., Halford W.P.* ICP0 Dismantles Microtubule Networks in Herpes Simplex Virus-Infected Cells. *PLoS One* 5 (6): e10975, 2010.
10. *Lymberopoulos M.H., Bourget A., Abdeljelil N.B., Pearson A.* Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology* 412, 341-348, 2011.
11. *Normand G. King R.W.* Understanding cytokinesis failure. *Adv Exp Med Biol.*, 676, 27-55, 2010.
12. *Parkinson J., Everett R.D.* Alphaherpesvirus proteins related to herpes simplex virus type 1 ICP0 affect cellular structures and proteins. *J. Virol.*, 74, 10006-10017, 2000.
13. *Roizman B.* Polykaryocytosis induced by viruses. *PNAS* ,48, 228-234, 1962.
14. *Sattentau Q.* Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6, 11, 815-26, 2008.
15. *Stanley P.* Chromosome Damage Induced by Herpes Simplex Virus Type 1 in Early Infection. *J. Gen. Virol.* 67, 2273-2277, 1986.
16. *Whitley R.J. Roizman B.* Herpes simplex virus infections. *Lancet*, 357, 9267, 1513-8, 2001.
17. *Zakaryan H., Stamminger T.* Nuclear remodelling during viral infections. *Cell Microbiol* 13, 6, 806-813, 2011.

Ստացվել է 10.10.2011