

ИЗМЕНЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК L<sub>929</sub>  
ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПБП IN VITRO

А.А.Галоян, В.А.Шахламов, В.В.Малайцев

*/Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана НАН РА/  
375044, Ереван, ул.П.Севака, 5/1**Ключевые слова:* цитокины, ПБП, ультраструктура, опухолевые клетки

Открытие новой семьи цитокинов, продуцируемых нейросекреторными клетками гипоталамуса, и расшифровка их первичной структуры [1] сыграли важную роль в развитии нейроиммунологии, так как впервые из нейронов выделяются цитокины мозга — серия пролинбогатых полипептидов (ПБП). Получены моноклональные антитела в отношении одного из этих ПБП, состоящих из 150 аминокислотных остатков, и разработан метод гистохимического определения наличия этого цитокина как в микроструктурах мозга, так и в первичных и вторичных иммунных органах (тимус, селезенка, лимфатические узлы), даже в нервных волокнах и клетках спинного мозга [2]. Накоплен большой экспериментальный материал, свидетельствующий о нейропротекторных и иммуномодуляторных эффектах ПБП на иммунокомпетентные клетки крови [3–6]. Опыты показали также, что ПБП заметно дозозависимо ингибирует пролиферативную активность опухолевых лимфоцитов человека (Jurkat cells). Более того, установлено характерное влияние ПБП на активность тиоловых ферментов каспаз [2, 3, 6, 9] нейробластомы 2 NA. Причем, активирующее влияние ПБП каспаз 2 и 6, ингибирующее воздействие на каспазы 3 и 9, проявляется лишь на дифференцированных бутиратом нейробластомы [8]. Эти данные свидетельствовали о том, что, по-видимому, ПБП может влиять на жизнедеятельность лимфоцитов и других клеток, стоящих на различных уровнях их дифференцировки и функционального состояния.

В настоящем исследовании мы задались целью изучить влияние ПБП на ультраструктуру опухолевых клеток фибробластов — L<sub>929</sub>.

**Материал и методы**

Эксперименты были проведены на 3-суточных культурах опухолевых клеток фибробластов L<sub>929</sub>. Культура клеток была выращена на культуральной среде RPMI-1640 с 10% фетальной сывороткой теленка с добавлением 2 мМ глутамина и 50 мкг/мл гентамицина в условиях CO<sub>2</sub> инкубатора. Были использованы следующие серии:

- I — L<sub>929</sub> без воздействия (контроль);
- II — L<sub>929</sub> с добавлением в культуральную среду L<sub>929</sub> ПБП до конечной концентрации 10<sup>-5</sup>М;
- III — L<sub>929</sub> с добавлением ПБП до конечной концентрации 10<sup>-6</sup>;
- IV — L<sub>929</sub> с добавлением ПБП до конечной концентрации 10<sup>-7</sup>М.

Материал для электронно-микроскопических исследований взяли через 24 ч после воздействия ПБП на культуральные клетки.

Смывы центрифугировались, затем подвергались фиксации 2,5% глутаральдегидом на какодилатном буфере (рН=7,3) с последующей дофиксацией 1% четырехокисью осмия на том же буфере. Заливка в эпон, аралдит или вестопал W. Опыты повторены трижды. Ультратонкие срезы в количестве 80 сеток изучены под электронным микроскопом. Кроме того, в культуре клеток изучена митотическая активность как в контроле, так и во всех сериях эксперимента.

#### Результаты и обсуждение

В контроле (1 серия) митотическая активность составляла 80%, а после воздействия галармином суммарно во II, III, IV сериях составляла 20,8%, из них 14% были К-митозы.

По сравнению с контролем (рис.1, 2), под воздействием ПБП в концентрации  $10^{-5}$  изменяется ультраструктура как зрелых так и незрелых опухолевых клеток  $L_{929}$  (рис. 3). Для зрелых клеток эти изменения заключаются в резком расширении агранулярной цитоплазматической сети, фрагментации ядра и цитоплазмы, разрушении внутренних мембран набухших митохондрий (рис. 4). Что же касается незрелых клеток, то они подвергаются другому виду изменений в ультраструктуре — появляются пикнотические ядра (рис. 5), ядра с кариорексисом и кариолизисом, резко выраженный микроплазматоз. Гранулярная и агранулярная цитоплазматические сети не подвержены изменениям. Одновременно обращает на себя внимание в текстуре цитоплазмы зрелых и незрелых клеток  $L_{929}$  огромное количество моно- и полисом.

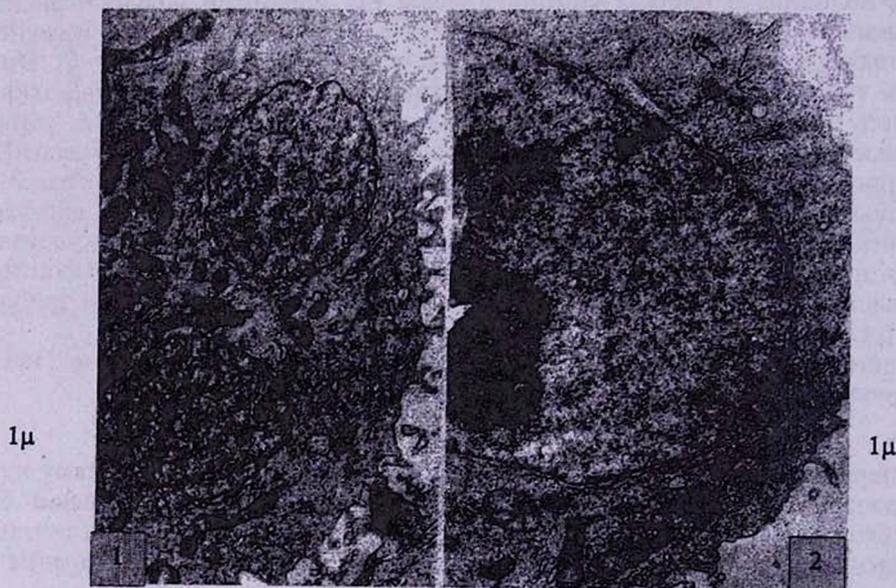


Рис. 1. 3-суточная двуядерная опухолевая клетка. Монослойная культура  $L_{929}$ . Контроль. Многочисленные митохондрии цистерны агранулярного и гранулярного ретикулума. Слабо выражена ретекстура цитоплазмы, видны моно- и полисомы. Ув.6000.

Рис. 2. Опухолевые клетки  $L_{929}$ . Контроль. Ядро, ядрышко, цитоплазма, зрелые и юные митохондрии. Деталь клетки. Ув. 10000.

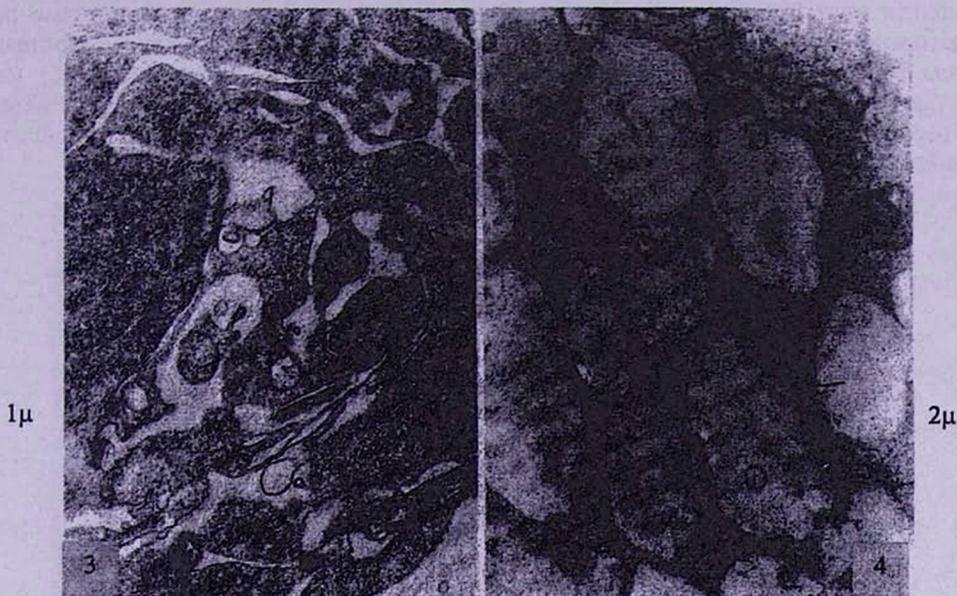


Рис. 3. Монослойная культура зрелой опухолевой клетки  $L_{929}$  после воздействия галармином в концентрации  $10^{-5}$ . Демонстрируется фрагментация ядра и цитоплазмы. Ув. 10000.

Рис. 4. 3-суточная опухолевая клетка из монослойной культуры  $L_{929}$  после 24- часового воздействия галармином в концентрации  $10^{-5}$ М. Демонстрируются разрушенные отечные митохондрии в цитоплазме. Ув. 20000.

При добавлении в культуру  $L_{929}$  ПБП в концентрации  $10^{-6}$ М и  $10^{-7}$ М в культуральных клетках в основном имеет место явление микроплазматоза, осуществляемого из плазмалеммы клеток (по В.А.Шахламову, 1971). В их цитоплазме также много моно- и полисом, встречаются единичные разрушенные митохондрии, но в основном митохондриальный аппарат сохранен. В них расширенными остаются внутрикristные промежутки. Всюду в цитоплазме на периферии клеток обнаруживаются везикулы различного диаметра (от 50 до 200 нм и более), которые, сливаясь между собой, образуют крупные везикулы и вакуоли (рис. 6).

Одновременно была подсчитана митотическая активность в контроле и опытах. В контроле она составляла 80%, а после воздействия ПБП суммарно в II, III, IV сериях составляла 20,8%, подавление митотической активности было более четко выражено во II серии опытов.

Обращает на себя внимание во II, III, IV сериях появление К-митозов, суммарно они составляли 14%. Полученные данные свидетельствуют о том, что ПБП подавляет митотическую активность в концентрации  $10^{-5}$  более интенсивно, чем в других изученных концентрациях.

Данные анализа ультраструктуры в монослойной культуре  $L_{929}$  свидетельствуют, что ПБП в концентрации  $10^{-5}$  подвергает разрушению опухолевые клетки, их ультраструктуру. Разрушению подвергаются как зрелые, так и незрелые опухолевые клетки. Прежде всего гибнет энергетическая система клеток (митохондрии). Одновременно страдает и плазмалемма (явление микроплазматоза). Уси-

ливаются синтез белков цитоплазмы (моно- и полисомы). Вместе с процессами создания идут процессы разрушения клетки, к 24 часам после воздействия пептида происходит разрушение клетки. Это разрушение у зрелых клеток протекает путем фрагментации ядра и цитоплазмы, а у незрелых опухолевых клеток — внезапным разрушением ядер (кариопиктоз, кариорексис и кариолизис). Всюду в препаратах при большой концентрации ( $10^{-5}$ ) пептида встречаются разрушенные мембраны и фрагментированные цитоплазматические отростки.

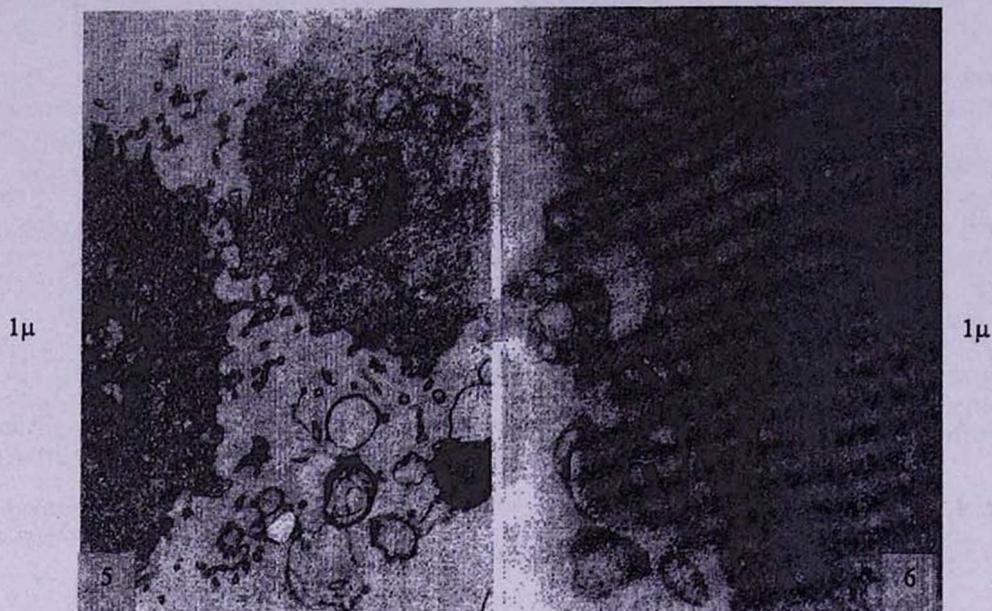


Рис.5. Незрелые опухолевые клетки 3-суточной  $L_{929}$  после воздействия галармином в концентрации  $10^{-5}$ . Пикнотически измененные ядра. Усиленный микроплазматоз. Единичные митохондрии. Детрит разрушенных клеток. Ув. 6000.

Рис.6. Опухолевая клетка 3-суточной монослойной культуры  $L_{929}$  после 24-часового воздействия галармином в концентрации  $10^{-6}$ . Демонстрируется микроплазматоз, микровезикулы различного диаметра, митохондрии. Ув. 20000.

Таким образом установлено, что ПБП в концентрации  $10^{-5}$  ведет к разрушению 3-суточных опухолевых клеток  $L_{929}$ , снижает их митотическую активность, способствует появлению К-митозов (патологическое митотическое деление). Концентрации ПБП  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  менее активно воздействуют на культуральные клетки  $L_{929}$ .

*Поступила 12.12.00*

**L<sub>929</sub> ՈՒՌՈՒՅՔԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԱՆԴՐԿԱՌՈՒՅՎԱԾՔԱՅԻՆ  
ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՊՐՈԼԻՆՈՎ ՀԱՐՈՒՍ ՊՈԼԻՊԵՊՏԻԴԻ  
ԱԶԳԵՑՈՒԹՅԱՆ ՆԵՐՔՈՒՆ IN VITRO**

**Ա.Ա.Գալոյան, Վ.Ա.Շախլամով, Վ.Վ.Մալայցեվ**

Մեր կողմից առաջին անգամ հիպոթալամուս-նեյրոհիպոֆիզ համակարգի նեյրոսեկրետոր գրանուլներից անջարվել են պրոլինով հարուստ մի խումբ պոլիպեպտիդներ:

In vitro պայմաններում ուսումնասիրվել է L<sub>929</sub> ֆիբրոբլաստային ուռուցքային բջիջների վրա այդ պոլիպեպտիդներից մեկի /AGAPEPAEPAQPGVY/ ազդեցությունը: Էլեկտրոնային մանրադիսկոպիային հետազոտությունները պարզեցին, որ նշված նյութի 10<sup>-5</sup>-10<sup>-7</sup> M խտությունը խիստ կերպով փոխում է բջիջների ենթաբջջային կառուցվածքը, հարկապես 10<sup>-5</sup> M խտության դեպքում: Փոխվում է ինչպես հասուն, այնպես էլ ոչ հասուն բջիջների կառուցվածքը:

Տեղի է ունենում ցիտոպլազմի և կորիզների ֆրագմենտացիա, քայքայվում են միտոքոնդրիումների ներքին թաղանթները: Դիվում է կարիոլիզիսի և կարիոռեքսիզի երևույթ: Խիստ ճնշվում է բջիջների միտոզը:

Ենթադրվում է, որ այս պոլիպեպտիդը կարող է օգտագործվել ֆիբրոբլաստային ուռուցքային հիվանդությունների բուժման համար:

**THE CHANGES OF L<sub>929</sub> CELLS ULTRASTRUCTURE UNDER PROLINE-REACH  
POLYPEPTIDE IN VITRO**

**A.A.Galoyan, V.A.Schachlamov, V.V.Malaytsev**

There were isolated from the neurosecretory granules of bovine neurohypophysis several new proline reach polypeptides (PRP) possessing immunotropic activity. One of them (AGAPEPAEPAQPGVY) was studied on the ultrastructure of L<sub>929</sub> fibroblast cells in vitro. Electron microscopic investigation showed that PRP. (10<sup>-5</sup>-10<sup>-7</sup>M) produces fragmentation of cytoplasm and nucleus rupture of the inner membranes of mitochondria, cariolyse and cariorexis. The data obtained indicate that PRP probably can be used for treatment of fibroblast tumors.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Galoyan A.A. Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus - Endocrine Heart. Moscow, 1997,
2. Galoyan A.A., Bedian V., Melikyan N., Vartazaryan N.D. Neurochemistry RAS & NAS RA, 2000 (in press).
3. Davtyan T.K., Muradyan E.B., Avanesian L.A. Proceeds. of the Intern. Small Conference on Brain and Immune System, Yerevan-Dilidjan, Neurochemistry RAS & NAS RA, 1998, 15, 1, p.45.
4. Априкян В.С., Галоян А.А. Мед. наука Армении НАН РА, 1980, 2, с.23.
5. Априкян В.С., Галоян А.А. Мед. наука Армении НАН РА, 1999, 4, с.29.
6. Априкян В.С., Галоян А.А. Нейрохимия, 2000, 17, 1, с.60.
7. Галоян А.А., Шахлამов В.А., Богданов И.М., Малайцев В.В. Исследование иммуномодулирующих свойств нейропептида гипоталамуса, PRP in vitro. (в печати).
8. Galoyan A.A., Terio N., Berd M.J., Marks N. Нейрохимия, 2000.