

Морфометрические изменения ядер клеток СаСо-2 под воздействием хронической инфекции вирусом полиомиелита (Sabin)

З.А. Карамян, Ю.А. Магакян, Л.О. Аброян, Л.А. Акопян, З.Б. Семерджян,
А.Э. Меликсетян, Е.М. Каралова

Отдел физико-химической биологии клетки Института молекулярной биологии НАН РА
375009, Ереван, ул. Асратяна, 7

Ключевые слова: полиовирус, хроническая вирусная инфекция, ядро, ядрышко, плоидность

Живая полиомиелитная вакцина применяется в практическом здравоохранении уже более 30 лет, и за это время с ее помощью были достигнуты значительные успехи в борьбе с полиомиелитом. Несмотря на всестороннюю изученность возможных негативных клинических проявлений присутствия вируса в кишечнике человека, лишь в последнее время начали появляться данные о небезопасности такого соседства. Так, длительная персистенция полиовируса (Sabin)-1 у иммунодефицитного больного привела его к конвертации в опасный штамм Mahoney-1 [3]. Тем не менее живая полиомиелитная вакцина (Sabin) продолжает оставаться широко распространенным официальным препаратом, используемым ВОЗ, вследствие высокой эффективности.

Клетки линии СаСо-2, являются весьма удачной моделью кишечника человека, способной к самодифференцировке и образованию трехслойной клеточной структуры, соответствующей слизистой кишечника человека.

Целью нашей работы было получение модели длительной репликации полиовируса (Sabin) в клетках слизистой. Модель СаСо-2 – полиовирус, использовалась в ряде публикаций [7] и является адекватной для долговременных прогнозов и исследований. Нами впервые был проведен анализ морфометрических изменений клеток аденокарциномы толстого кишечника человека под воздействием хронической инфекции полиовируса (Sabin) и делается попытка объяснить эволюцию системы вирус – клетка на данной модели.

Материал и методы

Вирус. В работе использовалась живая полиомиелитная вакцина (OPV) штамм Sabin, (Polio SabinTM [oral] Poliomylitis vaccine, live attenuated) Polio virus TCID₅₀/dos I - 10⁶, II – 10⁵, III - 10^{5.8}.

Клетки. СаСо-2 – трансформированная перевивная линия аденокарциномы толстого кишечника человека. Клетки культивировались в среде Eagle с добав-

лением 20% фетальной бычьей сыворотки. Посевная доза 2 x 10⁵ клеток/мл. Монослой получали через 48 часов после начала пассирования. Клетки предоставлены Dr. Pascale Galea (Trophos), Марсель, Франция.

Хроническая вирусная инфекция (ХВИ) была получена путем однократного инфицирования 48-часового монослоя клеток СаСо-2, полиовирусом в дозе 0,001 TCD₅₀ на клетку.

Титрование вируса проводилось на интактных монослоях культуры СаСо-2 и чувствительной к полиовирусу культуре НЕр-2.

Цитофотометрия. Цитофотометрия проводилась рутинным методом с использованием ДНК-специфической окраски по Фельгену. Работу проводили на анализаторе изображений микрообъектов (сканирующий микроскоп-фотометр SMP-05 (Opton, DRD), управляющий и анализирующий компьютер Pentium III) и на созданной в отделе физико-химической биологии клетки ИМБ НАН РА программы многопараметрического анализа микрообъектов. Концентрацию ДНК получали путем деления абсолютных показателей содержания ДНК в ядре на показатели площади ядра.

Результаты и обсуждение

В результате однократного инфицирования 48-часового монослоя культуры СаСо-2 нами была получена инфекция с низкими титрами накопления вируса, с характерным для ряда персистентных инфекций островковым ростом культуры и замедленным воспроизводством клеток. Инфицированная культура продержалась три пассажа после заражения вирусом, затем клетки были полностью уничтожены вирусом. При биологическом титровании вируса на интактных монослоях культур НЕр-2 и СаСо-2, было показано, что вирус не меняет своих основных характеристик как в культуре СаСо-2, так и на клетках НЕр-2.

В инфицированной культуре прежде всего нас интересовали цитометрические и морфометрические ха-

рактеристики клеток. Морфологически клетки культуры, хронически инфицированной полиовирусом во II и III пассажах, по сравнению с контролем имели меньшие размеры и округлую форму. Ядро таких клеток также значительно уступало в размерах ядру клеток контрольной популяции.

Количественное изучение ядрышек в популяции CaCo-2 (рис. 1) показало, что при ХВИ происходило снижение содержания ядрышек в ядре. Тенденция к этому была заметна еще во II пассаже, но к III пассажу снижение среднего числа ядрышек на ядро стало достоверным как по отношению к контролю, так и предшествующим пассажам. Более того, при ХВИ полиовирусом в культуре появилась весьма значимая популя-

ция безядрышковых клеток, вследствие чего среднее число ядрышек на ядро стало менее 1.

При исследовании цитометрических и цитофотометрических показателей ДНК нами получены данные, представленные на рис 2. В целом количество ДНК популяции I пассажа соответствовало контрольным значениям, II пассажа – была равна $5,9 \pm 0,7$ «с», что не является достоверным по сравнению с 48-часовым контролем ($4,4 \pm 0,9$ «с») ($t=1,36$). Однако в III пассаже количество ДНК в клетках CaCo-2 резко сократилось и составляло всего $2,16 \pm 0,25$ «с» что являлось достоверным не только по отношению к контролю ($t=2,38$, $p<0,01$), но ко всем предыдущим пассажам.

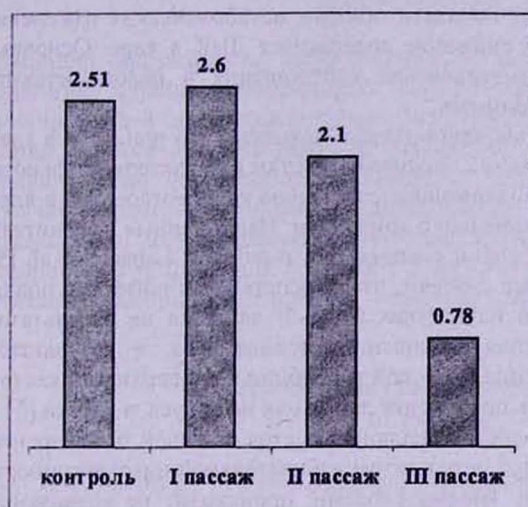


Рис 1. Изменение среднего числа ядрышек на ядро в культуре клеток CaCo-2 под действием хронической инфекции полиовируса /Sabin/

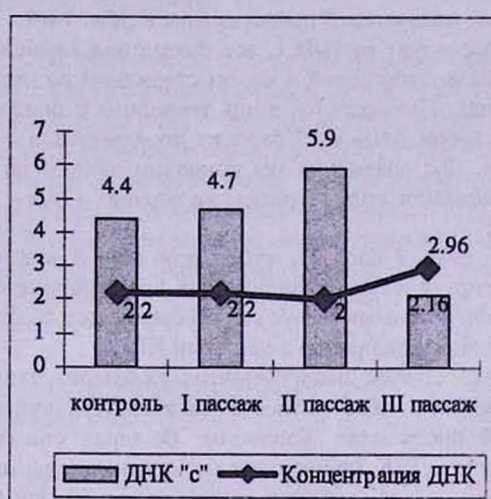


Рис 2. Изменение индексов ДНК в ядрах клеток CaCo-2 при ХВИ полиовирусом

Таблица 1

Ядрышково/ядерные показатели клеток CaCo-2 (I–III пассажи)*

Количество ядрышек в ядре	ДНК			Площадь		
	II пассаж ХВИ ОРВ	III пассаж ХВИ ОРВ	48 ч контроль	II пассаж ХВИ ОРВ	III пассаж ХВИ ОРВ	48 ч контроль
1	0,07±0,01	0,06±0,01**	0,08±0,01	0,05±0,01	0,07±0,01	0,07±0,01
2	0,09±0,01	-	0,07±0,02	0,06±0,01	-	0,06±0,01
3	0,1±0,02	-	0,1±0,01	0,07±0,01	-	0,09±0,01
4	0,11±0,02	-	-	0,1±0,04	-	-

* в целом таблица демонстрирует стабильные ядрышково/ядерные показатели

**тенденция по сравнению с контролем (число инверсий по u-критерию равно 1, $p<0,1$)

Нами также исследовались данные по концентрации ДНК в ядре. Измерение концентрации ДНК в ядре дало результат $2,04 \pm 0,15$, что совпадает с данными 48-часового контроля ($2,2 \pm 0,16$) и несколько (недостаточно) выше концентрации при 24-часовой острой инфекции полиовирусом ($1,9 \pm 0,43$). Достоверные изменения этого показателя были получены в III пассаже ($2,96 \pm 0,22$, $p < 0,005$). Как следует из графика, эти показатели совпадают со снижением количества ДНК в ядрах клеточной популяции.

С учетом данных о значении ядрышкового/ядерных соотношений, в культуре СаСо-2 нами было проведено исследование этих показателей как при хронической, так и острой инфекции полиовируса в культуре [4]. Полученные данные по изучению ядрышкового/ядерных показателей представлены в табл. 1 и 2.

Как следует из табл. 1, все показатели ядрышкового/ядерных соотношений в целом стабильны во всех измерениях. Наблюдается лишь тенденция к снижению ядрышкового ДНК в III пассаже по сравнению с контролем. Для сравнения мы приводим данные по острой инфекции полиовирусом на клетках СаСо-2 (см. табл. 2).

Из табл. 2 следует, что и при острой инфекции полиовируса ядрышкового/ядерные соотношения остаются неизменными не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с данными ХВИ.

Итак, данные экспериментов показали, что под воздействием ХВИ полиовируса в клетках культуры СаСо-2 происходят изменения. В ядрах снижается количество ДНК, происходит уменьшение содержания ядрышек на ядро, возникает популяция безядрышковых клеток. При этом ядрышкового/ядерные соотношения существенно не меняются, наблюдается лишь не выраженное снижение соотношения ДНК в III пассаже. Все это говорит прежде всего об угнетении ядрышковых функций и соответственно трансляционной и метаболической активности клеток хронически инфицированной культуры. При этом изменение физиологических характеристик клеток сопровождается и изменением их цитометрических параметров – снижением содержания ДНК. При анализе причин продемонстрированных изменений надо учесть, что

возникновение ХВИ на моделях клеточных культур является своеобразным компромиссом, с одной стороны, между скоростью репликации вирусных частиц и, с другой – скоростью деления клеток. При этом возникает относительно устойчивая система взаимодействия вирус – клетка. Такая инфекция может явиться результатом как изменения вируса – переход к менее вирулентной форме, так и клетки – появлению устойчивых к вирусной репликации клонов клеток. Допускается и совместная коэволюция клеток и вируса.

Давно известно, что физиологическая (имеется в виду метаболизм) активность персистентно инфицированных клеток бывает измененной, по сравнению с контрольными. Причем чаще наблюдается снижение активности инфицированных клеток [2]. Однако наши данные показали помимо метаболических изменений еще и снижение содержания ДНК в ядре. Основные морфометрические соотношения в целом остаются неизменными.

Итак, наши данные показали, что при ХВИ в клетках СаСо-2 выживают клетки с характерным фенотипом, содержащим сниженное количество ДНК в ядре, по сравнению с контролем. Наши данные в значительной степени совпадают с выводами Labadie et al. [5], которые считают, что персистентная инфекция полиовируса на клетках СаСо-2, является не результатом снижения репликации полиовируса, а результатом снижения вирусной адсорбции на поверхности клеток, то есть происходит эволюция не вируса, а клетки [5].

Подобная эволюция клеток, с нашей точки зрения, является результатом избирательной цитотоксичности вируса. Иными словами, происходит не коэволюция вируса и клетки, а избирательное, направленное изменение клеток, причем движущей силой этого является литическая вирусная инфекция, с одной стороны, уничтожающая наиболее чувствительные клетки, а с другой – модифицируя более устойчивые. Уничтожение высокочувствительных клеток объясняется многими факторами и, в частности, экспрессией вирусных рецепторов на поверхности клеток: таким рецептором для проникновения в клетку для полиовируса является CD155. И именно уровнем его экспрессии можно объяснить избирательную цитотоксичность на клетках СаСо-2 [6]. Модификацию клеток трудно объяснить лишь наличием/отсутствием специфических рецепторов. Однако ранее было показано, что двуспиральные (дсРНК) могут вызывать похожие фенотипические изменения в клетках [1]. Известно, что дсРНК является дериватом репликационного цикла ряда РНК вирусов, и в частности пикорнавирусов. Следовательно, изменения, происходящие в инфицированных клетках, можно условно разделить на две части: с одной стороны, происходит избирательная элиминация клеток, содержащих достаточное число CD155 на поверхности. С другой стороны, клетки, в которых проникновение вирусных частиц снижено за счет воздействия

Таблица 2

Количество ядрышек в ядре	ДНК	Площадь
	Острая инфекция OPV (12 ч)	Острая инфекция OPV (12 ч)
1	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01
2	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
3	0.1 ± 0.02	0.09 ± 0.01
4	0.08 ± 0.005	0.08 ± 0.01

ЭдсРНК, претерпевают фенотипические модификации. Объяснение, предложенное нами, дает ответ и на один из вопросов, поставленных еще в конце 70-х годов XX века [2]. Дело в том, что клетки с измененным метаболизмом и фенотипом под действием одного вируса оказываются чувствительными к действию другого вируса, при том, что резистентные к действию разных

вирусов клетки бывают часто весьма похожи фенотипически. Если принять механизм избирательной цитотоксичности вируса, то становится ясным, что новый вирус уничтожает все клетки, в том числе и модифицированные другим вирусом, из-за наличия на поверхности таких клеток достаточного количества вирусных рецепторов для нового вируса.

Поступила 09.02.06

CaCo-2 բջիջների կորիզների ձևաչափական փոփոխությունները պոլիոմիելիտային (Sabin) վիրուսի խրոնիկական վարակի ազդեցությամբ

Զ.Ա. Կարալյան, Յու. Ն. Մաղաքյան, Լ.Օ. Աբրոյան, Լ.Ն. Հակոբյան,
Զ.Բ. Մեմերջյան, Ն.Է. Մելիքսեթյան, Ե.Մ. Կարալովա

Փորձերի արդյունքները ցույց տվեցին, որ պոլիոմիելիտային վիրուսի խրոնիկական վարակի ազդեցությամբ CaCo-2 կուլտուրայի բջիջների կորիզներում նվազում է ԴՆԹ-ի քանակությունը, պակասում մեկ պոլիոմիելիտային բջիջների քանակը, ի հայտ է գալիս անկորիզակային բջիջների պոպուլյացիա: Այդ պայմաններում կորիզակ/կորիզ փոխհարաբերությունը էականորեն չի փոխվում, դիտվում է միայն ԴՆԹ-ի փոխհարաբերության ոչ ադրյան արտահայտված

նվազում III պատասխան: Այս ամենը առաջին հերթին վկայում է կորիզակային ֆունկցիայի ընկճման և, համապատասխանաբար, խրոնիկական վարակված կուլտուրայի բջիջների տրանսլյացիոն և մետաբոլիկ ակտիվության ընկճման մասին: Դրա հետ միաժամանակ բջիջների ֆիզիոլոգիական բնութագրերը ուղեկցվում են նրանց ցիտոֆոտոմետրիկ չափանիշների փոփոխություններով՝ կորիզային ԴՆԹ-ի պարունակությամբ նվազումով:

Morphometric changes of the CaCo-2 cells nuclei under influence of chronic polioviral (Sabin) infection

Z.A. Karalyan, Yu.H. Magakyan, L.O. Abroyan, L.H. Hakobyan, Z.B. Semerjyan, H.E. Meliksetyan,
Ye.M. Karalova

The results of experiments have shown that under influence of chronic polioviral infection in nucleus of CaCo-2 cells the DNA amount reduces, a reduction of the average number of nucleoli per nucleus, arising a non-nucleolar cells population is observed. Thus, nucleolar/nuclear ratio does not essentially vary, only some decrease in DNA ratio in the III passage takes place. All

this first of all testifies to inhibition of the nucleolar functions, and accordingly the translational and metabolic functions inhibition in chronically infected culture cells. Thus, the change of physiological characteristics of cells is accompanied by the cytophotometric indices changes – a decrease in the nuclear DNA amount.

Литература

1. Каралова Е.М., Камалян Л.А., Аброян Л.О., Акопян Л.А., Каралян З.А., Гаспарян М.Г. и др. Сравнительный анализ воздействия различных типов двуспиральных РНК на клетки рака гортани человека в культуре, Бюл. экспериментальной биологии и медицины, 2004, 137, 6, с. 682–7.
2. Соловьев В.Д., Хесин Я.Е., Быковский А.В. Очерки по вирусной цитопатологии. М., 1979.
3. Bellmunt A., May G., Zell R., Pring-Akerblom P., Verhaagen W., Heim A. Evolution of Poliovirus type I during 5.5 years of prolonged enteral replication in an immunodeficient patient, Virology, 1999, 265, 2, p. 178–184.
4. Karalyan Z.A., Jaghatspanyan N.G., Gasparyan M.H., Abroyan L.O., Hakobyan L.A., Ter-Pogossyan Z.R. et al. Morphometry of nuclear and nucleolar structures in a CaCo-2 cell line, Cell Biology International, 2004, 28, p. 249–253.
5. Labadie K., Pelletier I., Saulnier A., Martin J., Colbere-Garapin F. Poliovirus mutants excreted by a chronically infected hypogammaglobulinemic patient establish persistent infections in human intestinal cells, Virology, 2004, 5, 318(1): 66–78.
6. Masson D., Jarry A., Bauray B., Blanchardie P., Laboisie C. et al. Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma, Gut, 2001, 49: 236–240.
7. Pinto R.M., Diez J.M., Bosch A. Use of the colonic carcinoma cell line CaCo-2 for in vivo amplification and detection of enteric viruses, J. Med. Virol., 1994, 44(3): 310–5.