

Цитологический анализ действия индукторов интерферона различного происхождения и лейкоцитарного интерферона на трансформированную линию рака гортани человека в процессе культивирования

Е.М.Каралова, Л.О.Абоян, Л.А.Акопян, А.С.Аветисян, Н.Г.Джагацпанян,
Г.Е.Восканян, З.Б.Семерджян, З.А.Каралян

*Институт молекулярной биологии НАН РА
0014, Ереван, ул. Асратяна, 7*

Ключевые слова: двухспиральная РНК, циклоферон, интерферон, культура клеток НЕр-2, ядро, ядрышко, ДНК

Проведено цитологическое исследование интерферона, а также естественных и синтетических индукторов интерферона: лейкоцитарного человеческого интерферона, двухцепочечных низкомолекулярных РНК фагового и дрожжевого происхождения и синтетического индуктора интерферона – циклоферона, который является препаратом акридинового ряда на трансформированную линию рака гортани человека в процессе культивирования. Последний хорошо зарекомендовал себя при лечении целого ряда заболеваний различной этиологии [3]. Индукторы интерферона способны индуцировать выработку эндогенного интерферона и характеризуются низкой токсичностью, что делает их перспективными препаратами при лечении онкологических заболеваний [1,9]. При этом действие этих препаратов проявлялось на уровне нуклеинового обмена [10,14,18]. Они широко применяются в клинике, однако биологические особенности их, в частности в области влияния на генетический аппарат клеток, изучены недостаточно. Эти препараты являются перспективной группой противораковых соединений широкого спектра действия, в основном за счет индукции интерферона, к которому добавляется еще и цитотоксическое их действие [5,17].

Материал и методы

В работе использовали перевивную клеточную культуру рака гортани человека НЕр-2. Клетки

культивировались в среде EAGLE MEM, с добавлением глутамина и 10% бычьей сыворотки. Посевная доза 1×10^5 клеток/мл. Клетки представлены лабораторией U 322 INSERM "Retrovirus et maladies associees" Марсель и Институтом полиомиелита, Москва. Монослой получали через 24 и 48 часов после начала пассирования. В часть флаконов с покровными стеклами через 24 часа после посева вводили Na^+ -дс-РНК, в другую – Ca^{2+} -дс-РНК, в третью – ничего не добавляли (контроль). Стекла изымали через 24 часа (контроль), 48 и 72 часа. В часть флаконов через 48 часов от начала посева вводили циклоферон в концентрации 12,5 мкг/мл, в другую – вводили стандартный нативный интерферон в дозе 1000 Ед/мл, в третью (контроль) – ничего не добавляли. Покровные стекла из флаконов изымали через 48 часов (контроль), 72 и 96 часов от начала посева. Все препараты фиксировали в 96% этиловом спирте в течение 30 минут, а затем окрашивали фуксином по Фельгену на ДНК в течение 1,5 часов после гидролиза в 5н НС1 при 22°C в течение 60 минут [7]. Количественное определение комплекса ДНК-фуксин, площади и периметра ядра и каждого из ядрышек в отдельности и суммарно производили на микроскопе-фотометре SMP-05 (Opton), оснащенном компьютером и видеокамерой, телевизионным методом на максимуме поглощения (λ 575 нм). Перед сканированием изображения ядер и ядрышек (с вовлечением околоядрышкового хроматина) оконтуривали (объектив: 100/1,30). В

качестве эталона ДНК использовали лимфоциты периферической крови доноров, выявляли распределение ядер клеток культуры по ploидности (%) и определяли соотношение эу- и анеуплоидных клеток. Значения исследованных параметров выражали в условных единицах. Определяли плотность монослоя (число клеток, приходящихся на единицу площади) на всех сроках культивирования и при действии дс-РНК, интерферона и циклоферона параллельно, количество мертвых клеток среди них (в %), пролиферативную актив-

ность клеток на разных сроках культивирования (в %), среднее число ядрышек в ядрах (в %) и распределение ядер по числу ядрышек в них (в %) [6]. Достоверность различий средних значений оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, плотность монослоя культуры клеток НЕР-2 в контроле в течение трех суток культивирования увеличивается в среднем на 11%.

Таблица 1

Популяционные показатели культуры НЕР-2 в контроле и при воздействии на нее Na^+ - и Ca^{2+} -дс-РНК, циклоферона и интерферона

Группа	Сроки, час	Число клеток на 0.01 мм ²	Митозы, %	Мертвые, клетки, %	Среднее число ядрышек
Контроль	24	13.7±0.5	2.6±0.3	4.0±0.2	2.4±0.2
	48	15.1±0.4	3.5±0.3	3.3±0.3	2.8±0.2
	72	15.2±0.5	4.0±0.3	1.6±0.2	2.8±0.2
	96	23.1 ±8.4	2.9 ±0.1	0.6 ±0.1	1.8 ± 0.2
Na^+ -дс-РНК	24+24	4.0±0.2	2.0±0.1	5.0±0.3	2.4±0.2
	24+48	4.2±0.6	1.1±0.2	2.6±0.7	2.8±0.2
Ca^{2+} -дс-РНК	24+24	11.5±0.3	2.5±0.2	6.1±0.8	2.1±0.2
	24+48	15.5±0.5	2.1±0.2	4.6±0.8	2.5±0.3
Циклоферон	48 +24	21.4±5.9	2.9±0.1	11.9±2.9	2.2±0.3
	48 +48	17.2±4.4	0.6±0.1	39.4±5.4	2.1±0.4
Интерферон	48 +24	20.9±5.1	1.8±0.3	12.3±1.3	2.2±0.3
	48 +48	19.3±4.0	1.1±0.2	13.9±2.2	1.6±0.2

При изучении особенностей клеточной реакции на действие различных дс-РНК, циклоферона и интерферона оказалось, что при введении Na^+ -дс-РНК плотность монослоя уменьшается более чем

в три раза, при введении Ca^{2+} -дс-РНК через 48 часов культивирования число клеток на единицу площади монослоя уменьшается примерно на 14%, а к 72 часам восстанавливается до показателей

в контроле [6]. При действии интерферона и циклоферона к 96 часам она уменьшается на 20 и 34% соответственно. Значения этого параметра определяются интенсивностью размножения клеток и их гибели. Проллиферативная активность клеток в контроле в течение трех суток культивирования возрастает на 35%, затем уменьшается в среднем на 27%, в то время как при действии всех испытуемых биологически активных веществ митотическая активность клеток резко подавляется, что особенно выражено в культуре, обработанной Na^+ -дс-РНК, интерфероном и циклофероном. Это свидетельствует об ингибирующем воздействии этих веществ на пролиферативную активность клеток. В контроле число мертвых клеток в процессе культивирования уменьшается, в то

время как при действии дс-РНК число их увеличивается примерно в два раза, а при действии циклоферона и интерферона процент мертвых клеток увеличивается в десятки раз (табл.1). В контроле среднее число ядрышек на ядро не меняется, тогда как при действии обоих видов дс-РНК уменьшается незначительно, а при действии циклоферона и интерферона уменьшается на 33 и 75% соответственно. Снижение среднего количества ядрышек связано с изменением характера распределения в популяции ядер по числу ядрышек в сторону увеличения ядер с малым их числом. Так, во всех экспериментах частично или полностью исчезают ядра с 4 и 5 ядрышками. При этом изменяется и распределение клеток по числу ядрышек в них (рис.1): так если в контроле

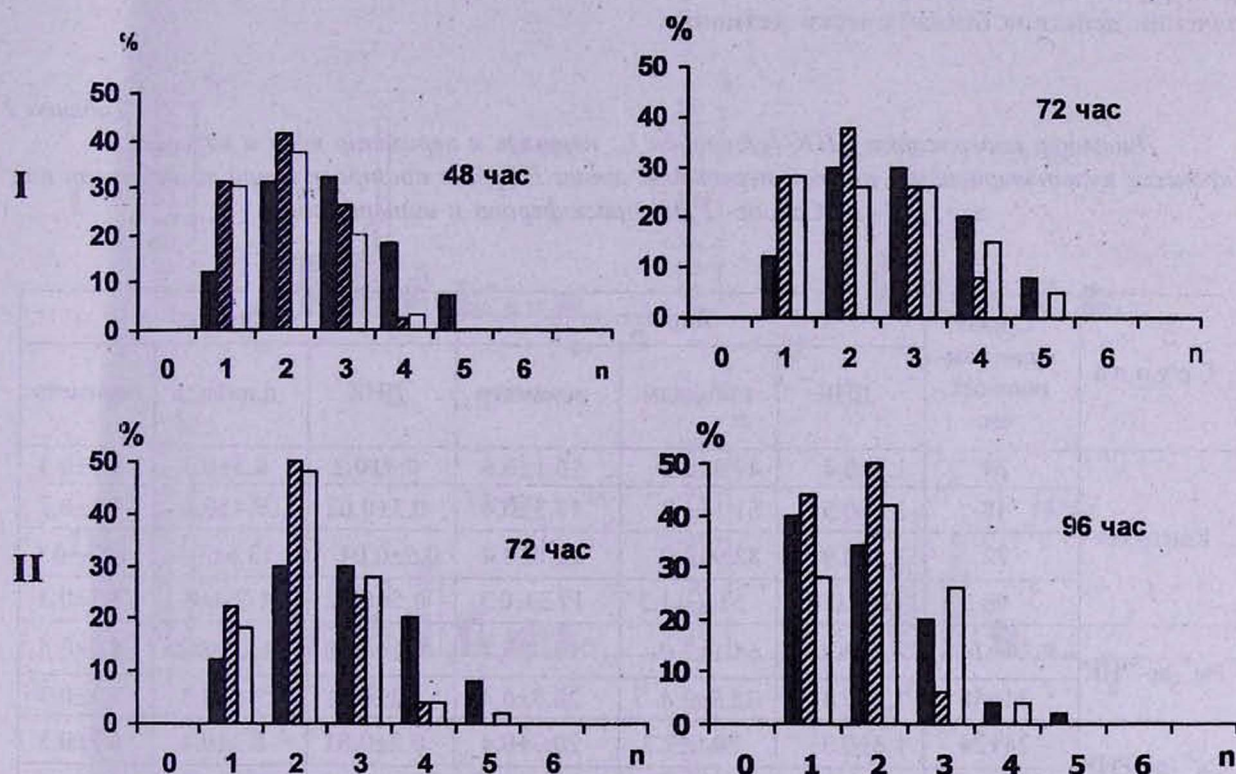


Рис. 1. Распределение ядер клеток культуры НЕР-2 по числу ядрышек в контроле и при действии дс-РНК (I), интерферона и циклоферона (II).

I ряд: черные столбики – контроль; заштрихованные – Na^+ -дс-РНК; белые – Ca^{2+} -дс-РНК;

II ряд: черные столбики – контроль; заштрихованные – интерферон; белые – циклоферон

1-, 2-ядрышковые клетки составляют примерно 42%, то при введении дс-РНК и циклоферона увеличиваются в среднем на 58-64%, а при действии интерферона – на 67-127%. Если многоядрышkovость рассматривать как показатель функциональной активности клеток, то эти данные свидетельствуют о подавлении активности клеток под действием исследуемых веществ, наиболее выраженном при введении интерферона, что согласуется со снижением содержания ДНК в ядрышке и зоне околядрышкового хроматина и уменьшением поверхности ядрышек во всех случаях, однако наиболее выраженном при действии интерферона. Эти данные хорошо согласуются с результатами исследований А.М. Малышевой и сотрудников, в которых применялся метод определения активности ядрышковых организаторов и пролиферативный потенциал гепатоцитов при изучении действия биологически активных

препаратов для лечения токсического цирроза печени [8]. По мнению авторов, этот метод объективно отражает степень напряженности рибосомального синтеза и пролиферативной активности клеток. Определение среднего количества ДНК на ядро выявило его увеличение в течение четырех суток культивирования в среднем на 60%, в то время как при действии испытуемых биологически активных веществ содержание ДНК в ядрах уменьшается с разной степенью интенсивности: наиболее сильно – на 150% уменьшается содержание ДНК при действии Na^+ -дс-РНК и Ca^{2+} -дс-РНК, а меньше всего изменяется при действии циклоферона и интерферона (табл.2). При этом содержание ДНК в ядрышках и околядрышковом хроматине меняется незначительно как в процессе культивирования, так и при действии биологически активных веществ.

Таблица 2

Динамика содержания ДНК (ед.плоидн.), площадь и периметр ядер и ядрышек в процессе культивирования клеток перевивной линии НЕР-2 в контроле и при воздействии на нее Na^+ - и Ca^{2+} -дс-РНК, циклоферона и интерферона

Г р у п п а	Сроки культивирования, час	Ядро			Ядрышко		
		ДНК	площадь	периметр	ДНК	площадь	периметр
Контроль	24	1.5±0.4	47.3±2.2	16.1±0.6	0.3±0.2	8.3±0.3	8.1±0.3
	48	1.5±0.5	51.1±1.3	17.5±0.4	0.3±0.02	9.4±0.6	9.2±0.3
	72	3.3±0.9	82.9±2.0	22.0±0.4	0.5±0.04	13.6±1.1	10.5±0.6
	96	2.4±0.03	53.7±1.3	17.3±0.3	0.5±0.02	11.2.4±0.3	8.3±0.3
Na^+ -дс-РНК	24+24	2.3±0.7	64.1±2.0	19.4±0.4	0.4±0.02	11.0±0.8	8.9±0.5
	24+48	1.3±0.4	72.5±2.4	20.5±0.4	0.2±0.01	7.6±0.3	7.1±0.3
Ca^{2+} -дс-РНК	24+24	1.6±0.3	78.5±2.2	20.7±0.4	0.2±0.01	8.3±0.4	6.7±0.3
	24+48	1.4±0.05	62.7±1.5	18.4±0.3	0.2±0.01	8.3±0.2	7.5±0.3
Циклоферон	48+24	2.6 ± 0.09	68.4 ± 1.9	19.3± 0.3	0.4±0.03	8.1±0.4	8.5±0.5
	48+48	2.1 ± 0.05	50.2 ± 1.5	15.9± 0.3	0.4±0.02	7.4±0.3	6.7±0.3
Интерферон	48+24	2.7 ± 0.05	76.8 ± 1.8	20.7± 0.3	0.4±0.03	8.8±0.3	7.6±0.3
	48+48	2.5 ± 0.03	49.3 ± 1.6	16.5± 0.4	0.3±0.02	5.0±0.2	4.8±0.8

Важно отметить, что распределение ядер по плоидности в контроле и при действии интерферона меняется незначительно, в то время как при действии Ca^{2+} -дс-РНК и циклоферона число полиплоидных ядер культуры НЕР-2 увеличивается в среднем в 1,5-2 раза, в основном за счет значительного возрастания количества тетраплоидных ядер и почти полного исчезновения октаплоидных ядер. Наряду с этим во всех группах обнаруживается большое число ядер с "промежуточными" значениями количества ДНК, в частности между 2с и 4с, что скорее всего обусловлено прохождением клетками S-фазы клеточного цикла или даже задержкой во второй ее половине. Возможно, появление клеток со значениями ДНК между 4с и 8с является результатом блока 4с клеток в G_2 -фазе или прохождения фазы синтеза, но уже в следующем цикле без завершения предыдущего

делением, о чем свидетельствует наличие в популяциях 8с клеток (рис.2). Учитывая, что объектом исследования были клетки трансформированной культуры НЕР-2, высокий процент анэуплоидных клеток как в контроле, так и в опытах можно объяснить выраженной вариабельностью клеток данной культуры, число хромосом которой колеблется вокруг 77 [12,16]. Полученные результаты действия биологически активных веществ свидетельствуют, что все они вызывают уменьшение числа анэуплоидных клеток, наиболее выраженное при действии Ca^{2+} -дс-РНК и циклоферона (в среднем в 2-3 раза). Блок клеток в G_2 -фазе и формирование полиплоидных клеток при одновременном снижении пролиферативной активности обычно связывают с переходом клеток к дифференцировочным процессам.

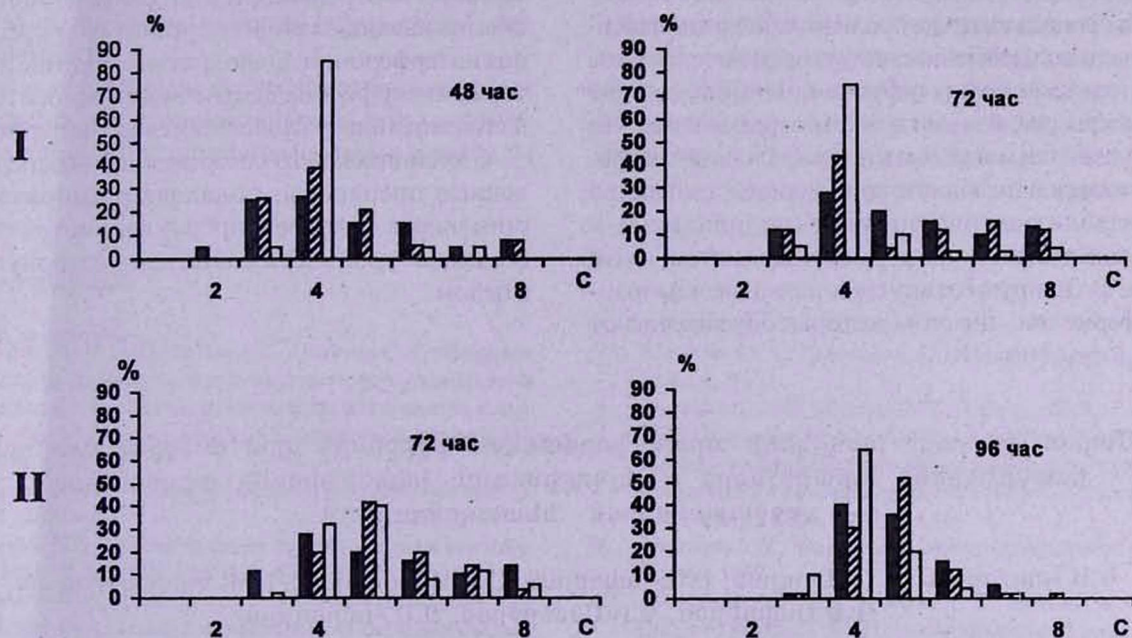


Рис. 2. Распределение ядер клеток культуры НЕР-2 по плоидности в контроле и при действии дс-РНК (I), интерферона и циклоферона (II). Остальные обозначения те же, что к рис. 1

Таким образом, полученные результаты говорят об ингибирующем в целом воздействии испытанных естественных и синтетических индукторов интерферона, а также лейкоцитарного человеческого интерферона на пролиферацию и другие стороны жизнедеятельности культуры клеток НВр-2 и демонстрируют различную степень выраженности этих сдвигов, что хорошо согласуется с литературными данными о подавлении пролиферативной активности клеток при действии интерферона и циклоферона на клетки аденокарциномы и лимфобластомы человека в культуре [2,11,17]. Об этом свидетельствуют и данные об уменьшении площади ядрышек во всех исследованных случаях, что также согласуется с литературными данными о том, что ядрышки являются возможным локусом для регуляции пролиферации и дифференцировки клеток [4,13,15].

Несмотря на отсутствие знаний о многих звеньях в цепи молекулярных событий, вовлекаемых в процессы запуска пролиферации и дифференцировки под действием индукторов интерферона и человеческого интерферона, наиболее общие процессы реализации этих программ в первом приближении могут быть представлены в следующей последовательности: под влиянием препаратов происходит активация митохондриальных и цитоплазматических ферментных систем, в том числе активируются внутриклеточные мембранные ферменты – циклазы, которые обуславливают

накопление в клетках циклического аденинмонофосфата (цАМФ) и циклического гуанинмонофосфата (цГМФ). Последние активируют ряд цАМФ- и цГМФ-зависимых протеинкиназ, которые в свою очередь запускают важнейшие для клеток метаболические процессы, такие как рост, размножение и дифференцировка.

Следовательно, можно заключить, что индукторы интерферона – вещества природного или синтетического происхождения, способные индуцировать в организме человека продукцию эндогенного интерферона, обладающего определенным преимуществом перед препаратами экзогенного интерферона: при введении в организм препаратов – интерферонотенов вырабатывается интерферон, не обладающий антигенностью, не возникает негативных эффектов, присущих препаратам экзогенного интерферона. Синтез индуцированного интерферона в организме сбалансирован и подвергается контрольно-регуляторным механизмам, обеспечивающим защиту организма от пресыщения интерфероном. Однократное введение индукторов интерферона обеспечивает относительно длительную циркуляцию эндогенного интерферона.

С медицинской точки зрения все вышеперечисленные препараты, подавляя размножение и стимулируя дифференцировку клеток, тем самым понижают уровень злокачественности популяции в целом.

Поступила 30.08.07

Մարդու ընկերական քաղցկեղի տրանսֆորմացված բջիջների վրա տարբեր ծագման իմունոֆերոնի խթանիչների և լեյկոցիտային իմունոֆերոնի ազդեցության բջջաբանական հետազոտություն

Ե.Մ.Կարալովա, Լ.Օ.Աբրոյան, Լ.Ա.Հակոբյան, Ա.Ս.Ավետիսյան, Ն.Գ.Ջաղացյանյան, Գ.Ե.Ոսկանյան, Ջ.Բ.Սեմերջյան, Ջ.Ա.Կարալյան

Կատարվել է իմունոֆերոնի և նրա բնական ու սինթետիկ խթանիչների, մասնավորապես՝ մարդու լեյկոցիտային իմունոֆերոնի ֆագային և խոնրասնկային ծագման ցածր մոլեկուլային երկշրթա ՌՆԹ-ի և ակրիդինային շարքի պատկանող իմունոֆերոնի սինթետիկ խթանիչ՝ ցիկլոֆերոնի մարդու ընկերական քաղցկեղի վերափոխ-

ված բջիջների վրա ունեցած ազդեցության բջջաբանական հետազոտություն:

Յույց է տրվել, որ հետազոտված բնական և սինթետիկ իմունոֆերոնային խթանիչները և մարդու լեյկոցիտային իմունոֆերոնը ցուցաբերում են տարբեր աստիճանի արտահայտված ընկճող ազդեցություն մարդու ընկերական քաղց-

կեղի շարունակական կուլտուրայի HEP-2 բջիջների պրոլիֆերացիայի և կենսագործունեության այլ կողմերի վրա: Հայտնաբերվել է, որ հետազոտված կենսաբանական ակտիվ նյութերի ազդեցության տակ տեղի է ունենում բջիջների արգելափակում G_2 -փուլում, ինչպես նաև պոլի-

պլոիդ բջիջների առաջացում պրոլիֆերատիվ ակտիվության նվազման հետ մեկտեղ, ինչն ամենայն հավանականությամբ պայմանավորված է բջիջների անցումով տարբերակման պրոցեսներին:

Cytological analysis of interferon of various origins and leukocytal interferon on the transformation line of human larynx cancer during cultivation period

Ye. M. Karalova, L. O. Abroyan, L. A. Hakobyan, A. S. Avetisyan, N. G. Jaghatspanyan, G. E. Voskanyan, Z. B. Semerjyan, Z. A. Karalyan

It was conducted a cytological study of interferon and its natural and synthetic inducers (leukocytal human interferon, double-stranded low molecular RNA of phagal and yeast origin, and cycloferon as synthetic inducer of interferon of acridine group) on the transformed cancer cell line of human larynx, HEP-2, during cultivation.

It was shown that the studied drugs cause G_2 -block of HEP-2 cells and develop polyploid cells, as well as decrease their proliferative activity, which is evidently

related to the switching of cells into differentiation processes.

The results obtained evidence the inhibiting effect of the studied natural and synthetic inducers of interferon, as well as the inhibiting effect of leukocytic interferon on proliferation and other features of the transformed continuous human cell line HEP-2 during cultivating period. Under the action of all interferon inducers there takes place evolution of cell line with formation of more differentiated subclones.

Литература

1. Баринский И. Ф., Давыдова А. Б., Грибенча С. Л., Лазаренко А. А. Эффективность индукторов интерферона ридостина и камедона в профилактике и лечении экспериментальных α - и флавированных инфекций. Вопросы вирусологии, 1996, т. 4, 3, с. 133-135.
2. Еришов Ф. И. Система интерферона в норме и патологии. М., 1996, с. 204.
3. Еришов Ф. И. Циклоферон: от эксперимента - в клинику. /Под ред. акад. Еришова Ф. И., СПб., 1997.
4. Земсков В. М., Лидак М. Ю., Земсков А. М., Микстайс У. Я. Индукция эндогенного интерферона. Низкомолекулярная РНК. Рига, 1985.
5. Камалян Л. А., Джагацпаян Н. Г., Гаспарян М. Г., Каралова Э. А., Тер-Погосян Э. Р. Противоопухолевое действие интерферонов и индукторов интерферона в эксперименте и клинике. Вopr. теор. и клин. медицины, 1999, т. 2, 4, с. 49-54.
6. Каралова Е. М., Камалян Л. А., Аброян Л. О. и др. Сравнительный анализ воздействия двуспиральных РНК (дс-РНК) различного происхождения на клетки рака гортани человека (HEP-2). Бюл. эксперим. биол. и мед., 2004, т. 137, 6, с. 682-688.
7. Магакян Ю. А., Каралова Е. М. Цитофотометрия ДНК. Ереван, 1989.
8. Мальшева А. М., Попков П. Н., Куренков Е. Л., Рябинин В. Е., Гробовой С. И. Активность ядрышковых организаторов в гепатоцитах крыс с циррозом печени после лечения биологически активными препаратами. Бюл. эксперим. биол. и мед., 2006, т. 142, 7, с. 114-117.
9. Мкртчян Л. Н., Камалян Л. А. Интерфероны в онкологии. Ереван, 1989.
10. Akanitapichat P., Lowden C. T., Bastow K. F. 1,3-Dihydroxyacridone derivatives as inhibitors of herpes virus replication, Antiviral Res., 2000, 45, 2, p. 123-134.
11. Baron C., Tying C. K., Fleishmann B. R., The interferons mechanisms of action and clinical applications, JAMA, 1991, 266, 10, p. 1375-1385.
12. Chen T. R. Links Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEP-2 karyotypes, Cytogenet. Cell. Genet., 1988, 48, 1, p. 19-24.
13. Fjelde A., Holterman O. Life Science, 1962, 12, 2, p. 683-692.
14. Fujiwara M., Okamoto M., Watanabe M., Machida H. Higeta S., Konno K., Yokota T., Baba M. Acridone derivatives are elective inhibitors of HIV-1 replication in chronically infected cells, Antiviral Res., 1999, 43, 3, p. 189-199.

15. Jorezen J. A., Bonacci B.B., Palmer R.E. et al. Rbm 19 is a nucleolar trotein expressed in crypt/progenitor cells of the intestinal epithelium, *Gene Expr. Patterns*, 2005 Jul. 16; 5, p. 512-518.
16. Mikhailova G.R., Rodova M.A., Perekrest V.V., Demidova S.A., Zhdanov V.M. Karyologic study of transplantable cell lines. II. Comparative analysis of lines HEP-2, FL and RH, 1978, *Tsitologia*, Feb; .20, 2, p. 232-235.
17. Narovliankii A.N., Deriabin P.G., Verhinina M. Iu., Mezentseva M.V., Ershov F.L. Effect of interferon inductors on infection induced by hepatitis C virus and activity of mRNA cytokines in cell cultures SW-13 and MT-4, *Vopr. Virusol.*, 2002 Dec; . 47, 6, p. 17-21.
18. Takemura Y., Ju-ichi M., Ito C., Furukawa H., Tokuda H. Studies on the inhibitory effect of some acridine alkaloids on Epstein-Barr virus activation, *Planta Med.*, 1995, .61, 4, p. 366-368.