

ВЛИЯНИЕ СОЛКОСЕРИЛА НА ПОПУЛЯЦИОННЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ПАРАМЕТРЫ КУЛЬТУР HeLa И RD

© Ю. А. Магакян, З. А. Каралян, Е. М. Каралова, Л. О. Аброян, Л. А. Акопян, М. Г. Гаспарян, Н. Г. Джагацян, З. Б. Семерджян, З. Р. Тер-Погосян

*Институт молекулярной биологии НАН РА, Ереван:
электронный адрес: tigmag@sci.am*

Методами цитоморфометрии и цитофотометрии исследовали изменения популяционных и клеточных параметров культур HeLa и RD после введения в среду солкосерила. Определяли плотность монослоя, пролиферативную активность клеток, долю мертвых клеток в монослое, число ядрышек в ядрах и распределение клеток в популяциях по этому показателю, содержание РНК в цитоплазме, количество РНК и ДНК в ядре и ядрышках, объем и полную поверхность ядер и ядрышек. Показано, что солкосерил оказывает влияние на поведение исследованных культур как на популяционном, так и на клеточном уровнях их организации. Полученные данные свидетельствуют о том, что солкосерил не стимулирует пролиферативную активность клеток в культуре. Действие солкосерила проявляется главным образом в усилении белок-синтетической активности клеток. Это позволяет считать его биологически активным соединением, проявляющим свойства фактора регуляции роста клеток и клеточных популяций.

Ключевые слова: культура клеток, пролиферация, солкосерил, ядро, ядрышко.

Перевиваемые культуры часто используются в качестве модельных клеточных систем для изучения характера и степени воздействия различных соединений на клетки. Ранее нами было исследовано поведение клеток культуры Her2 после введения в среду низкомолекулярных Na^+ -дс-РНК и Ca^{2+} -де-РНК (Каралова и др., 2003) и установлено, что эти соединения подавляют пролиферацию клеток, причем Ca^{2+} -де-РНК обладает большей степенью воздействия (Каралова и др., 2004). Результаты этих работ побудили нас изучить влияние на клетки и клеточные популяции солкосерила — вещества биогенного происхождения, представляющего собой депротенинизированный гидролизат крови телят. Дополнительным стимулом для проведения этого исследования послужила характеристика производящей фирмы, согласно которой солкосерил способен активизировать репаративные и регенеративные процессы, синтез коллагена, окислительное фосфорилирование, потребление кислорода и транспорт глюкозы в метаболически истощенные клетки (ISN, Швейцария).

Солкосерил используется в медицинской практике для ускорения процессов регенерации (Краснов и др., 1962; Мурашко, Чегемова, 1979; Машковский, 1986). Однако сведений о влиянии солкосерила на клетки и клеточные популяции в культуре мы не нашли.

Материал и методика

Для исследований были выбраны клеточные линии HeLa и RD как наиболее контрастные по своим параметрам, что было показано нами ранее с помощью мно-

гопараметрического кластер-анализа (Magakyan et al., 2009). Клетки высевали в дозе 10^5 кл./мл и культивировали в среде Игла—МЕМ с добавлением 10 % бычьей сыворотки и глутамин в 6-ячейковых планшетах с покровными стеклами. В часть ячеек при посеве вводили 5%-ный раствор солкосерила (10 мкл/мл). Через 24 и 48 ч после начала культивирования стекла извлекали и фиксировали в 96%-ном этаноле. Для выявления ДНК препараты окрашивали фуксином по Фельгену в модификации Магакяна и Караловой (1989). Для выявления РНК использовали галлоцианин-хромовые квасцы (Sandritter et al., 1954). Измерения содержания ДНК (λ 575 нм) и РНК (λ = 634 нм) проводили на анализаторе изображений (об. 100×, ок., 1.30×), созданном на базе сканирующего микроскопа-фотометра SMP-05 (Opton, ФРГ), используя программу UPIAM-2000 (Ю. А. Магакян, А. Л. Капанцян, Т. Ю. Магакян). При этом определяли плотность монослоя (число клеток на 0.01 мм^2), количество мертвых клеток (на 0.01 мм^2 монослоя), число митозов (на 1000 клеток), количество ядрышек в ядрах и распределение клеток в популяции по этому показателю (в %), содержание РНК в ядре и цитоплазме (в усл. ед.), содержание ДНК в ядре (в усл. ед.), объем (в мкм^3) и площадь поверхности (в мкм^2) ядер, суммарный объем (в мкм^3) и полную площадь поверхности (в мкм^2) ядрышек, суммарную массу ДНК (околоядрышковый хроматин) и РНК в ядрышках (в усл. ед.). Для каждого из параметров вычисляли средние арифметические и средние взвешенные, а также их ошибки. Число экспериментов в контроле и опыте было равно 6. Для статистической обработки использовали программу SPSS (Дубнов, 2004).

Изменения в значениях популяционных и клеточных параметров культур HeLa-229 и RD под воздействием солкосерила ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Параметры	Культуры	Сроки культивирования и группы			
		24 ч		48 ч	
		интактная (контроль)	введение солкосерила	интактная (контроль)	введение солкосерила
Популяционные: число клеток на 0.01 мм ²	HeLa	9.5 ± 0.6	4.2 ± 0.3	8.7 ± 0.3	7.5 ± 0.5
	RD	20.1 ± 0.7	21.2 ± 0.3	19.5 ± 0.7	19.5 ± 0.9
число митозов на 1000 клеток	HeLa	0.30 ± 0.05	0.10 ± 0.03	0.12 ± 0.04	0.04 ± 0.02
	RD	0.30 ± 0.05	0.30 ± 0.05	0.23 ± 0.05	0.16 ± 0.04
число мертвых клеток на 0.01 мм ²	HeLa	5.3 ± 1.0	11.7 ± 4.8	3.0 ± 0.7	6.3 ± 1.2
	RD	16.9 ± 1.5	16.2 ± 0.3	25.0 ± 2.6	23.6 ± 1.5
Клеточные: масса РНК в цитоплазме, усл. ед.	HeLa	411.2 ± 8.0	423.6 ± 10.5	216.8 ± 7.5	252.5 ± 10.3
	RD	128.9 ± 61	147.4 ± 6.8	110.1 ± 2.3	124.2 ± 2.1
масса ДНК в ядре, усл. ед.	HeLa	146.0 ± 6.2	140.2 ± 6.1	15.4 ± 3.2	122.2 ± 6.2
	RD	193.5 ± 15.5	193.5 ± 9.7	167.3 ± 3.2	227.3 ± 15.3
масса РНК в ядре, усл. ед.	HeLa	225.1 ± 5.7	231.0 ± 7.1	136.3 ± 5.5	162.5 ± 4.3
	RD	76.0 ± 3.2	103.6 ± 18.5	64.2 ± 1.5	83.7 ± 1.8
объем ядра, мкм ³	HeLa	648.0 ± 19.0	760.0 ± 26.5	581.0 ± 14.9	645.3 ± 12.7
	RD	565.1 ± 23.3	607.7 ± 36.5	484.1 ± 21.2	546.3 ± 21.7
площадь поверхности ядра, мкм ²	HeLa	168.5 ± 3.7	175.9 ± 3.7	164.1 ± 2.2	155.5 ± 3.5
	RD	159.8 ± 4.3	152.7 ± 4.2	133.8 ± 3.3	154.1 ± 4.2
суммарная масса ДНК в ядрышках, усл. ед.	HeLa	14.3 ± 1.0	14.2 ± 1.1	7.4 ± 0.4	9.4 ± 0.8
	RD	15.8 ± 0.9	18.2 ± 1.1	18.1 ± 0.8	27.1 ± 1.7
суммарная масса РНК в ядрышках, усл. ед.	HeLa	21.2 ± 1.4	22.8 ± 1.2	16.9 ± 1.7	17.9 ± 1.1
	RD	19.3 ± 1.1	21.0 ± 1.2	14.5 ± 0.7	15.7 ± 0.8
суммарный объем ядрышек, мкм ³	HeLa	14.6 ± 0.6	22.0 ± 1.6	8.2 ± 0.8	12.4 ± 0.6
	RD	11.8 ± 0.7	22.9 ± 0.6	16.4 ± 0.6	650.0 ± 3.2
полная поверхность ядрышек, мкм ²	HeLa	17.9 ± 0.7	26.4 ± 1.3	10.3 ± 1.3	22.5 ± 1.1
	RD	19.3 ± 0.9	24.7 ± 1.1	13.6 ± 0.8	22.0 ± 6.2
среднее число ядрышек в ядрах	HeLa	2.20 ± 0.05	2.31 ± 0.07	2.10 ± 0.06	2.02 ± 0.04
	RD	1.90 ± 0.01	1.70 ± 0.01	2.20 ± 0.02	2.20 ± 0.02

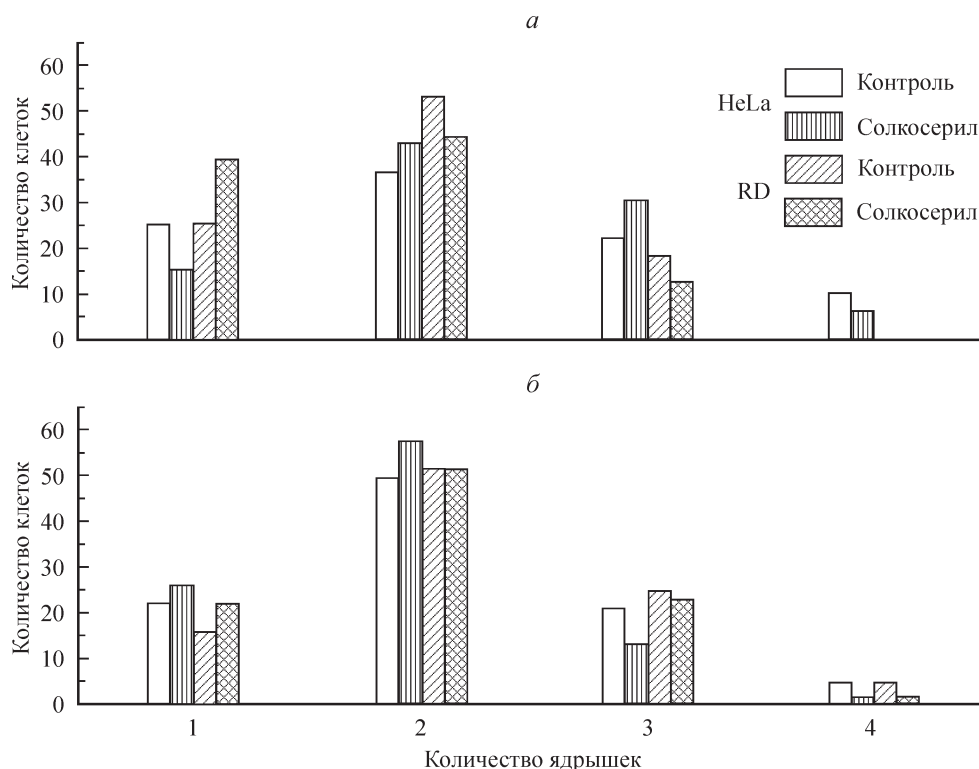
Результаты и обсуждение

Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что в культуре HeLa плотность монослоя под влиянием солкосерила через 24 ч после начала культивирования резко падает по сравнению с интактной культурой, но через 48 ч увеличивается и достигает плотности монослоя в интактной культуре. Число митозов, несмотря на постоянное снижение в ходе культивирования, в контрольной культуре в 3 раза превышало число митозов в культуре с солкосерилом. Количество мертвых клеток при воздействии солкосерила более чем вдвое превышало их количество в контрольной культуре. Исходя из вышесказанного резкое снижение плотности монослоя в культуре с солкосерилом, наблюдающееся через 24 ч после начала культивирования, может объясняться с одной стороны, низкой пролиферативной активностью клеток в опытной группе, а с другой — их более высокой гибелью. Последний фактор, возможно, играет даже большую роль в изменении плотности монослоя, чем пролиферация клеток, поскольку, несмотря на падение митотической активности клеток через 48 ч после начала культивирования, концентрация клеток в этот период увеличивается (см. таблицу).

В отличие от культуры HeLa введение солкосерила практически не влияло на плотность монослоя культуры

RD. Число клеток на 0.01 мм² сохранялось в течение опыта на постоянном уровне, который был в 2—2.5 раза выше, чем в культуре HeLa (см. таблицу). Пролиферативная активность клеток через 24 ч культивирования в интактных культурах RD и HeLa находилась на одинаково высоком уровне. При этом высокая митотическая активность клеток RD в отличие от клеток HeLa поддерживалась на протяжении всего периода наблюдений как в интактной культуре, так и в культуре с солкосерилом. Через 48 ч после начала культивирования митотическая активность клеток RD превышала таковую клеток HeLa в контрольной культуре в 2 раза, а в опытной — в 4 раза. Количество мертвых клеток в культуре RD возрастало к 48 ч после начала культивирования и на всех сроках было значительно выше, чем в культуре HeLa. При этом солкосерил не оказывал влияния на уровень гибели клеток.

Влияние солкосерила на клеточные параметры культуры HeLa было неоднозначным. На всех сроках культивирования солкосерил не оказывал влияния на содержание ДНК в ядрах и суммарную массу РНК в ядрышках. Вместе с тем введение солкосерила вызывало повышенное содержание РНК в ядрах и цитоплазме и суммарной массы ядрышковой ДНК через 48 ч после начала культивирования. В контроле и опыте к 48 ч культивирования суммарный объем ядрышек снижался примерно вдвое, а их полная поверхность — на 42.5 и 14.8 % соответствен-



Распределение клеток в популяциях по количеству ядрышек в ядрах.

а — через 24 ч культивирования, *б* — через 48 ч культивирования.

но. Объем ядер при введении солкосерила к 24 ч повышается, а к 48 ч понижается. При этом площадь поверхности ядер на всех сроках культивирования при действии солкосерила не отличалась от контрольных значений. Можно полагать, что введение солкосерила в среду, в которой культивировали клетки, оказывает влияние лишь на отдельные популяционные и клеточные параметры этой культуры. Солкосерил ингибировал митотическую активность клеток HeLa, вследствие чего их концентрация через 24 ч падала, и приводил на всех сроках культивирования к увеличению по сравнению с контролем объема ядер, суммарного объема и полной поверхности ядрышек, а также к увеличению на 48 ч массы РНК в ядре и суммарной массы ДНК в ядрышках.

Данные, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что объемы и площади поверхности ядер в клетках HeLa заметно превышали эти же показатели для клеток RD как в контрольных, так и в опытных культурах. Подобный результат, вероятно, связан прежде всего с тем, что модальное число хромосом в клетках HeLa-229 (78) значительно больше, чем в клетках RD, у которых оно равно 49 (Мамаева, 2002). Вместе с тем следует отметить, что масса ДНК в ядрах клеток культуры RD заметно превышала таковую в клетках HeLa. Известно, что в активно пролиферирующих клетках концентрация ядерной ДНК значительно выше, чем в покоящихся или слабо пролиферирующих клетках (Никольский, 1984). Результаты, приведенные в таблице, свидетельствуют о том, что количество митозов в контрольных и опытных клеточных популяциях RD значительно больше, чем в популяциях клеток HeLa. Поэтому более высокое, чем в ядрах клеток HeLa, содержание ДНК в ядрах клеток RD, вероятно, связано с более высокой пролиферативной активностью последних.

Содержание рибосомной РНК в цитоплазме клеток определяется многими факторами, среди которых прежде всего необходимо отметить функциональную активность ядрышек, скорость транспорта РНК из ядра в цитоплазму, стабильность РНК и скорость ее сплайсинга. Содержание РНК в ядрышках, ядрах и цитоплазме клеток HeLa и RD через 48 ч от начала культивирования снижалось как в контрольной, так и в опытной группах. Однако в клетках HeLa содержание РНК во всех указанных компартментах было выше, чем в клетках RD. Возможно, это связано с тем, что число ядрышкообразующих хромосом в клетках HeLa-229 несколько выше, чем в культуре RD (соответственно 10 и 9; Мамаева, 2002). Следует также отметить, что, несмотря на снижение содержания РНК в ядрышках, ядрах и цитоплазме клеток HeLa и RD в ходе культивирования, введение солкосерила в культуральную среду приводило к увеличению содержания РНК во всех исследованных компартментах клеток (см. таблицу).

Введение солкосерила в культуральную среду оказывает заметное влияние в клетках HeLa и RD на суммарную массу ДНК в ядрышках, их суммарный объем и полную поверхность (см. таблицу), которое, однако, проявляется лишь через 48 ч после начала культивирования. В связи с этим было предпринято более подробное исследование различных показателей, характеризующих активность ядрышкового аппарата.

Анализ показал, что среднее число ядрышек в клетках HeLa и RD слабо меняется в ходе их культивирования как в контрольных, так и в опытных культурах. Тем не менее следует отметить, что в опытной культуре RD среднее число ядрышек на 24 ч было меньше, чем в контрольной. В обеих культурах введение солкосерила оказывало заметное влияние на характер распределения клеток по чис-

лу ядрышек в ядрах. На представленных диаграммах (см. рисунок) видно, что на 24 ч под действием солкосерила доля одноядрышковых клеток в культуре HeLa по сравнению с контролем уменьшается, а в культуре RD, напротив, увеличивается. В интактных культурах HeLa и RD доля одноядрышковых клеток на 24 ч составляла около 30 %. К 48 ч доля одноядрышковых клеток в популяциях обеих интактных культур уменьшалась, но в популяциях, находившихся под действием солкосерила, такие клетки сохранялись в большем количестве.

Доля клеток с двуядрышковыми ядрами в обеих клеточных культурах была наибольшей. При этом количество таких клеток в процессе культивирования увеличивалось. Через 24 ч после начала культивирования доля двуядрышковых клеток в интактной культуре HeLa составляла 35 %, а через 48 ч — 50 %. Солкосерил увеличивал долю таких клеток в популяции до 44 и 58 % соответственно. В интактной культуре RD доля двуядрышковых клеток на 24 ч культивирования была выше, чем в интактной культуре HeLa, и равнялась 55 %. К 48 ч доля таких клеток в культуре RD снизилась, составив 50 %. Под влиянием солкосерила доля двуядрышковых клеток в популяции культуры RD, которая через 24 ч после начала культивирования равнялась 45 %, несколько увеличивалась, достигнув, как и в контрольной культуре, 50 %.

Доля клеток с трехядрышковыми ядрами в популяциях обеих культур была намного меньше, чем двуядрышковых. Под воздействием солкосерила их доля в популяции HeLa через 24 ч после начала культивирования увеличивалась по сравнению с контролем, а к 48 ч сокращалась более чем вдвое. Численность трехядрышковых клеток в популяции RD под воздействием солкосерила в целом снижалась.

Наименее малочисленными в популяциях обеих культур были клетки с четырехядрышковыми ядрами. В популяции культуры RD на 24 ч такие клетки вообще отсутствуют и появляются лишь к 48 ч. Следует заметить, что в популяциях интактных культур HeLa и RD четырехядрышковых клеток больше, чем в культурах, находившихся под воздействием солкосерила. Таким образом, количество ядрышек в ядрах и доля в популяции клеток с тем или иным числом ядрышек в ядрах являются динамичными параметрами, что наглядно отражено на диаграммах (см. рисунок). Исходя из изложенного можно предположить, что введение солкосерила в среду в определенной степени препятствует образованию множественных ядрышек.

Итак, введение солкосерила в среду оказывало влияние на ряд популяционных и клеточных параметров клеток HeLa и RD. На популяционном уровне солкосерил проявлял свое действие только в клеточной линии HeLa. Через 24 ч после начала культивирования солкосерил приводил к снижению числа клеток на 0.01 мм^2 и числа митозов, а через 48 ч увеличивал число мертвых клеток. На клеточном уровне солкосерил в обеих культурах увеличивал содержание РНК в цитоплазме и ядре (48 ч), массу ДНК в ядрышках (48 ч), суммарный объем ядрышек и полную поверхность ядрышек (24 и 48 ч). В клетках HeLa введение солкосерила приводило к увеличению объема ядер. Из данных, представленных в таблице, следует, что в обеих клеточных культурах через 24 и 48 ч после введения солкосерила увеличивал суммарный объем ядрышек и их полную поверхность, а через 48 ч солкосерил увеличи-

вал содержание РНК в ядрах и цитоплазме клеток и суммарную массу ДНК в ядрышках.

Таким образом, можно заключить, что, несмотря на имеющиеся данные, согласно которым солкосерил оказывает стимулирующее влияние на регенерацию и репарацию, результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что пролиферативная активность клеток при действии этого препарата не усиливается. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что солкосерил является препаратом, который приводит к стимуляции белок-синтетической активности клеток.

Полученные в нашей работе результаты свидетельствуют также о том, что реакция клеток HeLa и RD на присутствие солкосерила в культуральной среде не является однозначной. Причинами подобной неоднозначной реакции культивируемых клеток могут быть как различия в происхождении клеток, так и присущая не только перевиваемым культурам, но и нормальным клеточным популяциям гетерогенность их клеточного состава. Полагаем, что для решения вопроса о свойствах солкосерила должна быть использована модель с гомогенными по происхождению клетками, для чего может подойти, например, синхронизированная первичная культура диплоидных фибробластов на первом пассаже. Тем не менее полученные нами данные, характеризующие поведение клеточных культур HeLa и RD при введении в среду солкосерила, могут представить интерес для специалистов в области клеточной биологии и фармакологии, тем более что свойства солкосерила на данный момент изучены химическими и фармацевтическими методами недостаточно (ISN, Швейцария).

Список литературы

- Дубнов П. Ю. 2004. Обработка статистической информации с помощью SPSS. М.: АСТ NTPress. 220 с.
- Каралова Е. М., Камалян Л. А., Аброян Л. О., Акопян Л. А., Гаспарян М. Г., Джагацпаян Н. Г., Каралян З. А., Тер-Погосян З. Р., Магакян Ю. А. 2003. Поведение клеток перевиваемой культуры Нер-2 и их ядерно-ядрышкового аппарата в процессе культивирования и под действием Na^+ -дс-РНК. Цитология. 45 (8) : 764—769.
- Каралова Е. М., Камалян Л. А., Аброян Л. О., Акопян Л. А., Каралян З. А., Гаспарян М. Г., Джагацпаян Н. Г., Тер-Погосян З. Р., Магакян Ю. А. 2004. Сравнительный анализ воздействия различных типов двуспиральных РНК (Na^+ и Ca^{2+} -дс-РНК) на клетки рака гортани человека (Нер-2) в культуре. Бюл. эксп. биол. мед. 137 (6) : 682—686.
- Краснов М. М., Каспаров А. А., Юлина Ю. В., Оганесянц В. А. 1962. Опыт применения солкосерила в лечении заболеваний роговицы. Вестн. офтальмол. 4 (1) : 64—67.
- Магакян Ю. А., Каралова Е. М. 1989. Цитофотометрия ДНК. Ереван: Изд-во АН АрмССР. 204 с.
- Мамаева С. Е. 2002. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Наука. 236 с.
- Машковский М. Д. 1986. Лекарственные средства. Пособие по фармакотерапии для врачей. М.: Медицина. 575 с.
- Мурашко В. В., Чегемова П. М. 1979. Солкосерил в лечении язвенной болезни. Сов. мед. 2 (1) : 97—99.
- Николевский Н. Н. 1984. Пролиферация клеток в культуре. В кн.: Биология клетки в культуре. Л.: Наука. 10—49.
- Magakian Yu. A., Karalova E. M., Karalyan Z. A., Abroyan L. O., Akopyan L. A., Gasparyan M. G., Dzhagatspanyan N. G., Semerdzhyan Z. B., Ter-Pogossyan Z. R. 2009. Multiparametric study and cluster analysis of transplantable human cell cultures. Cell Tissue Biol. 3 : 35—41.

Mamaeva S. E. 1998. Karyotypic evolution of cells in culture: a new concept. *Int. Rev. Cytol.* 178 : 1—40.

Sandritter W., Diefenbech H., Krantz F. 1954. Über die quantitative Bindung von Ribonukleinsäure mit Galloxyaninchromalaum. *Experientia.* 10 : 210—215.

Slater L. M., Sweet P., Hsu T. C., Chan P. K. 1992. Novel nucleolar and nuclear morphology in a vincristine-dependent human leukemia cell line. *Exp. Cell Res.* 198 : 170—174.

Поступила 14 VII 2009

THE INFLUENCE OF SOLCOSERYL ON POPULATION AND CELLULAR
PARAMETERS OF HELA AND RD CULTURES

*Yu. A. Magakian, Z. A. Karalyan, E. M. Karalova, L. O. Abroyan, L. H. Hakopyan,
M. G. Gasparyan, N. G. Jaghacpanyan, Z. B. Semerjyan, Z. R. Ter-Pogossyan*

Institute of Molecular Biology NAS RA, Yerevan;
e-mail: tigmag@sci.am

Changes of population and cellular parameters of HeLa and RD cultures after introducing of solcoseryl in culture medium were studied by methods of scanning cytophotometry and cytomorphometry. Monolayer density, proliferation activity, the number of dead cells in a monolayer, the number of nucleoli in nuclei and distribution of cells in the populations by this parameter, RNA and DNA masses in nuclei and nucleoli, total volumes and surface areas of the nuclei and nucleoli were determined. It has been shown that solcoseryl differently affects the cultures both on population and on cellular levels of their organization. The results of multi-parametric analysis of the influence of solcoseryl on the cultures allow considering it as a biologically active compound with the features typical for cell and cell population growth regulating factors.

Key words: cell cultures proliferation, solcoseryl, nuclei, nucleoli.
