

© Л. Н. Носач, О. Ю. Повница, В. Л. Жовноватая

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КЛИНОСТАТИРОВАНИЯ НА СОСТОЯНИЕ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Клиноостатування епітеліальних (Hela) і лімфобластоїдних (MT-4) клітин людини протягом 96—144 год не приводить до значних змін морфології і життєздатності клітин. Зберігається проліферативна активність клітин, функціональна активність мітохондрій і здатність лізосом накопичувати флюорохром.

Проводимые в течение ряда лет наземные и космические эксперименты свидетельствуют о влиянии микрогравитации на структуру и функциональную активность органелл растительной клетки [6, 7]. В некоторой степени клетки животных также чувствительны к микрогравитации [3, 5, 10]. Условия измененной силы тяжести могут изменять форму, размеры, степень адгезии к субстрату, функциональную активность клеток. Отмечены различия в функциональной активности лимфоцитов, полученных из крови здоровых доноров и культивируемых на орбите или из крови космонавтов [4, 5, 11].

Проведенное нами изучение влияния клиноостатирования на состояние перевиваемых клеток человека является первым этапом для последующих исследований особенностей функционирования системы клетка — вирус в условиях микрогравитации.

Объектом исследований были две линии перевиваемых клеток человека: линия эпителиальных клеток Hela (рак шейки матки), которую культивировали в монослое на твердых носителях (стеклянных или пластиковых флаконах) и суспензионная линия лимфобластоидных клеток человека Т-фенотипа — МТ-4. Для моделирования микрогравитации проводили горизонтальное клиноостатирование со скоростью 4 об/мин («Клин-1», НПО «Респиратор», Донецк) в течение 96—144 ч.

Клетки Hela предварительно выращивали во флаконах при стационарном горизонтальном положении в термостате (37 °С) в течение 24 ч. Затем часть образцов подвергали клиноостатированию при той же температуре. Контролем служили клетки, которые продолжали инкубировать в горизонтальном положении. Лимфобластоидные клетки МТ-4, которые культивируются в суспензии и не требуют твердых носителей, сразу помещали в клиноостат. До начала клиноостатирования и через каждые 24 ч клиноостатирования (24, 48, 72, 96, 120 и 144 ч) определяли жизнеспособность и некоторые показате-

тели функциональной активности клеток. Жизнеспособность клеток определяли двумя методами:

1 — при окраске трипановым синим и подсчете живых и мертвых клеток в камере Горяева;

2 — МТТ-методом, который основан на функционировании дегидрогеназной системы митохондрий живых клеток, способных превращать желтый субстрат 3-(4,5-диметил тиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) в пурпурно-синий продукт МТТ-формаза, который может быть учтен спектрофотометрически [8]. Мертвые клетки такой способностью не обладают. Оптический сигнал, измеряемый в диапазоне волн поглощения МТТ-фармазана ( $\lambda = 540...570$  нм) после его растворения, отражает количество жизнеспособных клеток и свидетельствует о функциональной активности митохондрий. Данный метод широко используется для выявления цитотоксичности лекарственных препаратов [9].

Как видно из полученных нами данных (таблица), количество живых клеток линии Hela, определенное при окраске трипановым синим, нарастает с увеличением времени культивирования, хотя при клиноостатировании уровень прироста клеток снижен, увеличивается процент мертвых клеток по сравнению с контролем. Результаты по определению жизнеспособности клеток МТТ-методом представлены на рис. 1. Они также свидетельствуют о приросте живых клеток со временем культивирования (как в контроле, так и в опыте).

Таким образом, при клиноостатировании эпителиальных клеток Hela в течение 144 ч не только сохраняются живые клетки, но сохраняется функциональная активность их митохондрий и способность клеток к пролиферации. Об этом свидетельствует наличие в культуре митотических клеток, находящихся на разных стадиях митоза. Митотическую активность определяли после флюорохромии фиксированных клеток 0.01 % акридиновым оран-

**Влияние клиностаტიрования на жизнеспособность эпителиальных клеток HeLa, выявляемую при окраске трипановым синим**

Исследованные клетки	Время исследования, ч	Количество клеток		
		общее	живых	мертвых
До клиностаტიрования	0	219 999	205 555	14 444
При клиностаტიровании	24	318 333	281 110	37 222
Контроль	24	245 555	215 555	30 000
При клиностаტიровании	48	311 111	299 777	38 333
Контроль	48	359 999	315 555	44 999
При клиностаტიровании	72	372 777	278 888	102 777
Контроль	72	634 444	534 444	96 111
При клиностаტიровании	144	822 777	329 444	493 333
Контроль	144	1262 777	478 888	783 888

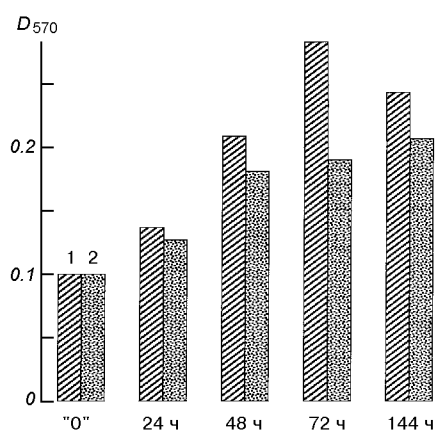


Рис. 1. Влияние клиностаტიрования на жизнеспособность клеток HeLa (МТТ-метод): 1 — контрольные, 2 — клиностаტიрованные

жевым и исследовании в люминисцентном микроскопе. В каждом из трех препаратов на один срок исследования определяли количество митотических клеток на 1000 просчитанных. С целью моделирования предстартовых условий суточную культуру клеток инкубировали при  $t = +4^{\circ}\text{C}$ , затем при  $37^{\circ}\text{C}$ . Опытные образцы подвергали клиностаტიрованию. Как видно из рис. 2, через 48 ч митотическая активность клиностаტიрованных клеток находится на уровне суточной культуры до инкубации на холоде, а в контроле — значительно выше.

Используя прижизненную флуорохромию клеток акридиновым оранжевым, мы судили о состоянии лизосом, которые в живых клетках выявляются в виде красно-оранжевых цитоплазматических гранул [1]. Наличие в клиностаტიрованных клетках таких гранул в виде скоплений в околядерной зоне свидетельствует о сохранности лизосом и способности их накапливать флуорохром.

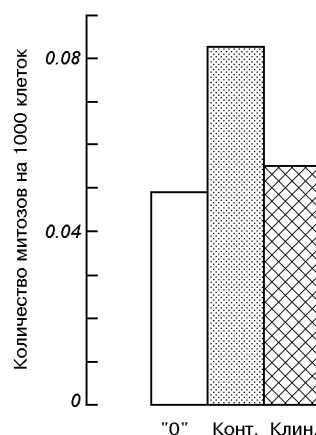


Рис. 2. Влияние клиностаტიрования на митотическую активность клеток HeLa

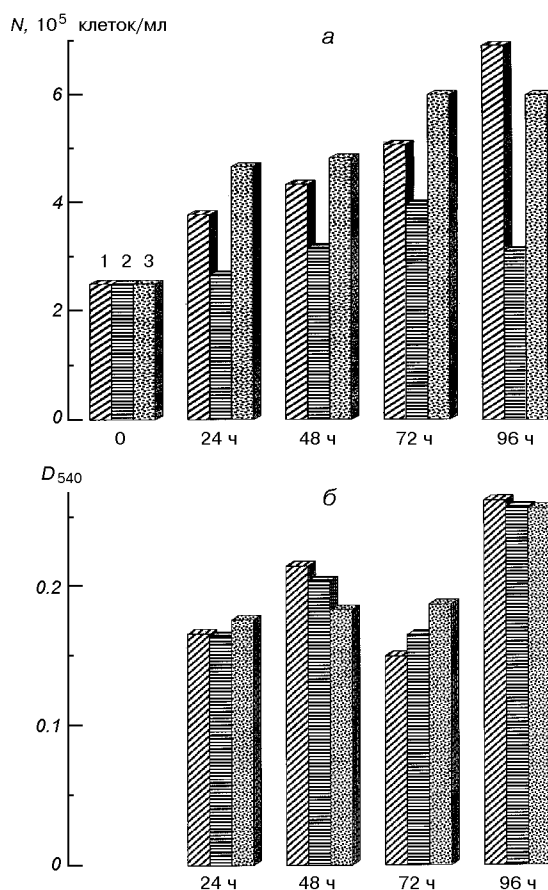


Рис. 3. Влияние клиностаტიрования на жизнеспособность клеток МТ-4 а — трипановый синий, б — МТТ-метод; 1 — контрольные (+CO), 2 — контрольные (-CO), 3 — клиностаტიрованные

Определение жизнеспособности лимфобластоидных клеток МТ-4 при окраске трипановым синим (рис. 3, а) свидетельствует об увеличении количе-

ства живых клеток в процессе их культивирования в течение 96 ч по отношению к «0». В связи с тем, что лимфобластоидные клетки культивировались в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>, а клиностамирование клеток проводилось без подачи CO<sub>2</sub>, использовалось два контроля клеток: инкубируемых в обычных для них условиях при наличии CO<sub>2</sub> и без него. Нами показано, что клетки МТ-4 обладают ростовой способностью и в отсутствие CO<sub>2</sub>, причем более выраженной при клиностамировании. Клиностамирование не только не снижает жизнеспособности МТ-4 клеток, но и сохраняет функциональную активность митохондрий, о чем свидетельствуют результаты применения МТТ-метода (рис. 3, б). В клиностамированных МТ-4-клетках также сохраняется функциональная активность лизосом.

Таким образом, перевиваемые клетки человека, культивируемые в условиях микрогравитации, могут быть использованы для изучения взаимоотношений между вирусом и клеткой. Удобной моделью для проведения таких исследований является аденовирус человека, которому свойственна не только цитотоксичная форма взаимодействия с клеткой, приводящая к образованию «потомства» вируса и гибели клетки, но латентная и интегративная — когда вирусная ДНК интегрирует в геном клетки-хозяина. Последние две формы взаимодействия вируса с клеткой могут переходить в цитотоксичную, приводящую к развитию инфекционного процесса в случае воздействия неблагоприятных эндо- и экзофакторов. Ранее нами было показано [2], что при длительном клиностамировании аденовирус сохранял инфекционность. Задачей наших дальнейших исследований будет выяснение возможности и особенностей репродукции аденовируса человека в условиях микрогравитации.

1. Зеленин А. В. Люминисцентная цитохимия нуклеиновых кислот. — М.: Наука, 1967.—136 с.
2. Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Тарасишин Л. А., и др.

Определение в наземных условиях температурного режима, длительности пребывания аденовируса человека на орбитальных станциях и влияния клиностамирования на некоторые его свойства // Космічна наука і технологія.—2003.—9, № 1.—С. 96—101.

3. Таирбеков М. Г. Гравитационная биология клетки (теория и эксперимент). — М., 1997.—128 с.
4. Cogoli A., Bechler B., Muller O., Hunzinger E. Effect of microgravity on lymphocyte activation // Proc. of the Norderney Symposium of scientific Results of the German Spacelab Mission D1, Norderney, Germany, 27-29 August 1986, Germany, 1986.—P. 366—375.
5. Duke P. J., Montufar-Solis D., Humazaki T., Sato A. Clinorotation of micromass cultures of mouse limb bud cells reduced nodule numbers, but not size // Abstracts 31-st Scientific Assembly of COSPAR 14—21 July, 1996.—The University of Birmingham, England, 1996.—P. 307.
6. Kordyum E. Effects of altered gravity on plant cell processes: results of recent space and clinostatic experiments // Adv. Space. Rev.—1994.—14, N 8.—P. 77—85
7. Kordyum E. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // Internat. Rev. Cyt.—1997.—171.—P. 1—78.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods.—1983.—65, N 1-2.—P. 55—63.
9. Pauwels R., Balzarini J., Baba M., et al. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds // J. of Virological Methods.—1988.—20.—P. 309—321.
10. Rodionova N. V., Oganov V. S. Morpho-functional adaptation in the bone tissue under the space flight conditions // J. Gravit. Physiol.—2001.—8, N 1.—P. 87—88.
11. Talas M., Batkai L., Stoger I., et al. Results of space experiment program «Interferon» // Acta Microbiol. Hungarica.—1983.—30, N 1.—P. 53—61.

#### INVESTIGATIONS OF THE INFLUENCE OF MICROGRAVITY ON THE STATE OF HUMAN CELL LINES

L. N. Nosach, O. Yu. Povnitsa, V. L. Zhovnovataya

Clinostating of epithelial (Hela) and limphoblastoid (MT-4) human cells over the period from 96 to 144 hours does not cause considerable changes of morphology and viability of the cells. The proliferative activity of the cells, functional activity of mitochondrions and the capacity of lysosomes to accumulate the fluorochrom are retained.