

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. о.о.БОГОМОЛЬЦЯ

---

На правах рукопису

Вятченко-Карпицький Сергій Всеволодович

ДЛЯ ІНТЕРФЕРОНА ТА ОЛІГОДЕНІЛАТІВ  
НА ІОННІ СТРУМИ ТА МОРФОЛОГІЧНЕ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ КЛІТИН  
ТРАНСФОРМОВАНИХ ЛІНІЇ НЕРВОВОГО ПОХОДЖЕННЯ

Спеціальність: 03.00.02 - Біофізика

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1995

AB 33.187

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00761199 (X)

Роботу виконано у відділі за  
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця

Наукові керівники:

- академік Платон Григорович Костик
- академік Ігор Сільвестрович Магура

Офіційні опоненти:

- чл.-кор. НАН України Олег Олександрович Кришталь
- д.б.н., проф. Валентин Леонідович Зима

Провідна установа: Інститут молекулярної біології  
генетики НАН України

Захист відбудеться "21" лютого 1995 р.  
на засіданні Спеціалізованої ради при  
Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Автореферат розісланий "4" травня 1995 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради  
доктор біологічних наук

З.О. Сорокіна-Маріна

ЛНБ ім. В. Стефаніка  
АН України

## ВСТУП

Актуальність проблеми. Відомо, що інтерферони утворюються в організмі і є одним з важливих елементів імунного захисту організму від зовнішньої інфекції. Інтерферони діють на рівні транскрипції та трансляції, пригнічують вірусні РНК та ДНК, змінюють якісно та кількісно синтез білків в організмі.

Крім антивірусної дії, інтерферони, змінюючи внутріклітинні метаболічні процеси, контролюють рост клітин, регулюють диференціювання та відповідь клітин на зміну гормонального статусу.

Інтерферони широко застосовують в клінічній практиці для лікування та профілактики багатьох вірусних інфекцій (СНІД включно), онкологічних та інших захворювань. Всі види інтерферонів мають спільні механізми дії; насамперед це системи 2'-5' олігоаденілатсинтетази та специфічні протейнікази.

Концентрація 2'-5' олігоаденілатів (2-5A) в живих системах змінюється в широких межах (від одиниць до сотен нМ), що залежить від функціональних властивостей клітин. При дії інтерферонів спостерігають значне підвищення (на 3-4 порядки) базального рівня 2-5A. Фосфорильовані 2-5A активують латентну РНК-азу (РНК-азу L), яка гідролізує мРНК, що інгібує біосинтез білка. Відомо також, що дефосфорильовані ("корові") олігоаденілати не впливають на РНК-азу L, мають значну біологічну активність.

При дослідженні механізму дії 2-5A на внутрішньоклітинні процеси треба враховувати його незначну здатність проникати крізь плазматичну мембрану клітин.

З літератури відомо, що в нейронах спінальних гангліїв миші та кішки інтерферон збільшує частоту генерації потенціалів дії. Такий само ефект зафіксовано при дії деяких корових 2-5A на нервові клітини молосків. Однак іонний аналіз дії інтерферона та 2-5A в літературі відбито не достанько. Особливе значення мають дослідження можливого впливу інтерферона та 2-5A на іонні струми, відкритий стан яких залежить від рівня внутрішньоклітинного фосфорильвання.

Трансмембранний рух іонів є в основі багатьох клітинних процесів. Під час росту клітин та їх диференціювання відбувається значна зміна іонної провідності клітинної мембрани. Враховуючи значний вплив інтерферонів на проліферацію, ріст і диференціювання

клітин, важливо вивчити особливості експресії іонних каналів при дії інтерферонів на нейрони та зв'язок їх з головними морфологічними параметрами диференціювання.

**Мета роботи.** Дослідження впливу людського  $\alpha 2$  - інтерферону та корових 2'-5' - олігоаденілатів на іонні струми та процеси, пов'язані з ростом та диференціюванням клітин людської IMR-32 та мишачої N1E-115 нейробластом, а також клітин лінії GN3 гіпофізарного походження.

**Задання.** I. Проаналізувати вплив інтерферону на зміну іонних струмів клітин.

II. Визначити вплив корових 2-5A на іонні струми досліджуваних клітин при надходженні 2-5A у внутрішньоклітинне середовище.

III. Дослідити експресію іонних струмів та параметри морфологічного диференціювання при культивуванні клітин в середовищі, що містить людський  $\alpha 2$  - інтерферон та корові 2'-5' - олігоаденілати.

**Наукова новина роботи.** Вперше досліджено вплив людського  $\alpha 2$  - інтерферону та корових 2'-5' - олігоаденілатів на трансмембранні іонні струми в трансформованих лініях клітин нейронального походження.

Доведено, що під час впливу людського  $\alpha 2$  - інтерферону на клітини людської нейробластоми IMR-32 відбувається модуляція натрієвих струмів. На більшості клітин спостерігалось збільшення амплітуди натрієвого струму.

При внутрішньоклітинному введенні олігоаденілата 2'-5'ArArA на клітинах всіх ліній, що тестувалися, спостерігався ефект, аналогічний дії людського  $\alpha 2$  - інтерферону на клітини людської нейробластоми.

Внутрішньоклітинне введення олігоаденілата 2'-5'ArArA приводило до збільшення амплітуди кальцієвого струму, який має високий поріг активації в клітинах лінії GN3.

Зміна концентрації магнію в розчині, що вводився в клітину істотно впливало на спостеріганий ефект: підвищення  $Mg^{2+}$  до рівня  $1mM$  різко зменшувало його, а до рівня  $5mM$  - практично усувало.

Нами виявлена відносно висока активність синтетичного олігоаденілата 2'-5'ArArероха, який досить стійкий до дії

фосфодіестераз.

Вперше показаний вплив  $\alpha 2$  інтерферона та корових 2'-5' олігоаденілатів на хід морфологічного диференціювання клітин людської IMR-32 та мишачої N1E-115 нейробластом.

Інкубування клітин людської IMR-32 нейробластоми в середі культивування, що містить людський  $\alpha 2$  інтерферон, протягом 24 годин приводило до збільшення густини чутливого до дії ТТХ натрієвого струму. Такий самий ефект спостерігався й під час інкубування в більш тривалі терміни (від кількох годин до кількох діб) клітин людської IMR-32 та мишачої N1E-115 нейробластом в середі культивування, що містило 2'-5'ArArA. На клітинах N1E-115 ефект дії  $\alpha 2$  інтерферона не спостерігався, що можна пояснити видоспецифічністю дії інтерферона.

**Практична цінність роботи.** Отримані нові результати про механізми процесів, що активуються під час дії інтерферона. Запропоновано простий метод порівняння ефективності дії різних олігоаденілатів. Проведено порівняльний аналіз дії декількох фізіологічних форм олігоаденілатів та нового штучно модифікованого аналога природніх 2'-5'A - 2'-5'ArArерохаA.

**Апробація роботи.** Основні положення роботи були викладені на семінарах секції біофізики Інституту Фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Київ, 1994) та на XIV з'їзді Українського фізіологічного товариства (Київ, 1-4 листопада 1994)

**Обсяг та структура дисертації.** Робота викладена на 160 сторінках друкованого тексту та ілюстрована 40 малюнками. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, описання методів досліджень та експериментальної частини, обговорення результатів, висновків та списку літератури з 199 найменувань. За матеріалами дисертації опубліковано 5 робіт.

**Методика досліджень.** Клітини вирощували в моношаровій культурі у пластикових флаконах з площиною поверхні 75 см<sup>2</sup> та в чашках Петрі діаметром 35 мм. Клітини пасирували кожні три-чотири доби в співвідношенні 1:2. Для вирощування клітин IMR-32 використовували середовище RPMI ("Sigma", USA) з додаванням 10% термоінактивованої сироватки ембріонів великої рогатої худоби ("Sigma", USA,

"Вектор", Росія). Для культивування клітин N1E-115 використовували середовище DMEM, що містило 10% сироватки ембріонів крупної рогатої худоби, а клітин лінії GH3 – середовище RPMI, до якого додавали 5% сироватки ембріонів великої рогатої худоби і 10% інактивованої кінської сироватки ("Sigma", USA). Клітини знаходились в CO<sub>2</sub> інкубаторі в газовому середовищі з 5% CO<sub>2</sub> при температурі +37 °C, pH 7.4. Через 2 години після прикріплення до субстрату среду культивування змінювали на відповідний інкубаційний розчин. Перед електрофізіологічними дослідженнями среду культивування в чашках Петрі змінювали на відповідний внутрішньоклітинний розчин.

Розроблена Hamill, Neher & Sakmann (1981) методика "patch clamp" на сьогодні є провідним методом досліджень іонних струмів через мембрану клітин. Вона дозволила значно підвищити ступень електричної ізоляції фрагмента клітинної мембрани, що створило принципово нові умови для реєстрації іонних струмів через ділянку мембрани. Електричний опір шунта між мембраною та кінцем реєструючої піпетки складає 10–100 Гом, що зменшує фоновий шум реєстрації до частин пікоампера. В своїх дослідженнях ми використовували піпетки, зроблені з молібденового скла.

Реєстрація даних проводилась за допомогою персонального комп'ютера IBM-AT 286. В деяких експериментах був використаний аналого-цифровий перетворювач NTA-1024 (Угорщина). Для реєстрації та обробки результатів використовувались пакети програм "Screep" і "Datasel".

Розрахунки площі соми, довжини нейритів диференційованих та недиференційованих клітин проводили по фотозображенням – використовуючи напівавтоматичний прилад MOP-3 (ФРН) для аналізу фотозображень. Кожний експеримент по дослідженню розвитку морфологічних ознак в процесі штучно викликаного морфологічного диференціювання проводили з обов'язковим контролем розвитку морфологічних ознак у нормальних умовах.

## Результати

### Дослідження дії α2-інтерферону людини та 2-5A на натрієвий струм

Клітини, що досліджували мали потенціал спокою від -55 до -30 мВ. Кінетичні характеристики натрієвого струму в клітинах пейробластоми людини IMR-32, розраховані за відомою методикою (Hodgkin, Huxley, 1952; Магура, Долгая, 1978), найбільш нагадують

параметри натрієвого струму в клітинах нейробластоми миші N1E-115.

Під час аплікації  $\alpha 2$  інтерферону людини в концентрації 600 од. активності/мл на клітини IMR-32 відбувається збільшення амплітуди швидкого натрієвого струму. Максимальне збільшення струму I спостерегалось на 5-10 хвиликах після початку аплікації інтерферону та складало  $151.1 \pm 28.9\%$  від амплітуди натрієвого струму  $I_0$  до початку аплікації. В 15 клітинах максимальне збільшення струму складало більш 200 % від значення амплітуди струму  $I_0$ .

Під час аплікації  $\alpha 2$ -інтерферону людини на клітини нейробластоми миші N1E-115 зміни амплітуди натрієвого струму не спостерегалось.

Для дослідження живих шляхів дії інтерферону на іонні струми ми додавали 2-5A до внутрішньопіпеточного розчину та спостерігали відносну зміну струму, що реєструється. Зміну амплітуди струмів визначали відносно реєстрації амплітуди струму, проведеної через 2 хвилини после прориву мембрани клітини ( $I/I_0$ ).

При додаванні 2-5A (10 мкМ/л) до внутрішньопіпеточного розчину спостерігали збільшення натрієвого струму ( $I/I_0 \times 100 = 128.6 \pm 16.2\%$ ) в клітинах IMR-32. Максимальне збільшення реєстрували на 5-10 хвиликах після прориву мембрани клітини. Ефект спостерігався в 15 клітинах з 24, що були протестовані. В 9 клітинах величина ефекту перевищувала 180% відзначення  $I_0$ . Найбільше зареєстроване збільшення - 246%.

Ефект, що спостерігався не зникав при заміні внутрішньопіпеточного розчину на такий, що містив іони магнію.

Аналогічну зміну натрієвого струму спостерігали при дослідженні за аналогічною схемою клітин нейробластом миші N1E-115. Загалом було протестовано 28 клітин. В 19 випадках при додаванні 2-5A до внутрішньопіпеточного розчину в концентрації 10 мкМ спостерегалось збільшення натрієвого струму на  $162.8 \pm 41.5\%$ . Від значення  $I_0$  було зареєстроване найбільше підвищення струму на 486%. Максимальна зміна величини струму спостерігалась на 10-20 хвиликах після прориву мембрани клітини. Підвищення амплітуди натрієвого струму залежало від концентрації 2-5A. Так при концентрації 2-5A 0.1 мкМ у внутрішньопіпеточному розчині середня величина збільшення амплітуди натрієвого струму  $I/I_0 \times 100\%$  складала  $119.5 \pm 15.2\%$ .

Дослідження впливу різних форм олігоаденілатів на кальцієві струми

Трансформовані клітини аденогіпофізу лінії GH3 є зручною моделлю для вивчення багатьох процесів, пов'язаних з функціонуванням нервових та секреторних клітин. В плазматичній мембрані клітин GH3 зафіксовані два типи потенціалкерованих кальцієвих каналів: T і L. Струм, що проходить крізь ці канали можна легко розкласти за допомогою зміни підтримуючого мембранного потенціалу. Наприклад, при підтримуючому потенціалі  $-40$  мВ реєструється тільки L струм, тоді як струм через T канали повністю інактивований.

Реєстрацію відносної зміни кальцієвих струмів під впливом 2-5A проводили так само, як і при дослідженні дії олігоаденілатів на натрієвий струм.

При використанні безмагнієвого внутрішньопіпеточного розчину, що містив  $10 \text{ мкМ } 2',5'\text{ArArA}$  зафіксовано збільшення амплітуди L струму. Загалом було протестовано 49 клітин. Максимальне зростання амплітуди струму ( $173.1 \pm 36.5$ ) спостерігалось на 8-15 хвилинах після прориву мембрани. На трьох клітинах збільшення струму не перевищувало 105% від рівня  $I_0$ , у 89% клітин рівень зростання амплітуди був більший за 130%. Найбільше зафіксоване збільшення струму було 495% від рівня  $I_0$ . При концентрації іонів магнію у внутрішньопіпеточному розчині ефект спостерігали тільки у 26% клітин, що були протестовані. При цьому амплітуда струму зростала максимум на 90%. При використанні внутрішньопіпеточного розчину, що містив  $5 \text{ мМ } \text{Mg}^{2+}$  достовірного зростання кальцієвого струму, який має високий поріг активації, не спостерегалось. Щоб з'ясувати дію іонів магнію в спостережуваному ефекті ми використовували внутрішньопіпеточний розчин, в якому EGTA було замінено на EDTA. При таких умовах ефект збільшення кальцієвого струму, що має високий поріг активації не зникав, а навіть дещо прискорювався.

Ми зробили також ряд досліджень, під час яких у внутрішньопіпеточний розчин додавали продукти гідролізу  $2',5'\text{ArArA}$ . Так наявність у внутрішньопіпеточному розчині  $1 \text{ мкМ}$  аденозину або  $10 \text{ мкМ}$  АТФ не приводило до суттєвих змін кальцієвого L струму. Якщо ж додати до внутрішньопіпеточного розчину проміжний продукт гідролізу  $2',5'\text{ArArA} - 2',5'\text{ArA}$  (також у концентрації  $10 \text{ мкМ}$ ) то з'являвся ефект, подібний до того, що відбувався під впливом  $2',5'\text{ArArA}$ , але значно менший.

Нами також досліджена форма олігоаденилатів 3',5'ArArA. Цей олігоаденилат не викликав ніяких змін в амплітуді кальцієвих струмів.

Вищезгадані форми олігоаденилатів 2',5'ArArA, 2',5'ArA та 3',5'ArA досить швидко гідролізуються під впливом фосфодіестераз. Штучно створений на основі 2',5'ArArA олігоаденилат 2',5'ArArероxуА відрізняється значно більшою стійкістю. При додаванні 2',5'ArArероxуА до внутрішньопіпеточного розчину спостерігався ефект, подібний до того, що відбувається під впливом 2',5'ArArA. Середнє зареєстроване значення збільшення амплітуди кальцієвого I струму складало  $140.4 \pm 22.0\%$  від рівня  $I_0$ . Було протестовано 18 клітин. Максимальне і мінімальне відхилення значення I від рівня  $I_0$  складало 206% та 104% відповідно. Підвищення концентрації іонів магнію у внутрішньопіпеточному розчині до рівня 5 мкМ викликало пригнічення ефекту, що спостерігався.

Наявність у внутрішньопіпеточному розчині всіх форм олігоаденилатів не приводила до зміни кальцієвого струму, що має низький поріг активації (T струм) як в мембранах клітин лінії GH3 так і лінії N1E-115.

#### Дослідження зв'язку між інтерферон- та 2-5A- індукованого морфологічного диференціювання клітин та експресію іонних каналів

При дослідженні процесів, пов'язаних з диференціюванням клітин необхідно чітко визначити ступінь диференціювання клітин. Існують загальні критерії морфологічного диференціювання досліджуємих клітин; а саме:

- 1) наявність аксоноподібних відростків (нейритів), за діаметром значно більших ніж діаметр семи клітин;
- 2) збільшення розміру семи клітин;
- 3) зниження митотичної активності клітин.

Розрахунки довжини нейритів нервових клітин можна проводити двома різними методами: вимірювати довжину найбільшого з існуючих нейритів або сумарну довжину нейритів клітини. В своїх дослідженнях ми використовували останній метод, який дає змогу провести більш адекватну оцінку штучного диференціювання клітин нейробластами.

Дослідження можливого впливу  $\alpha 2$  інтерферону людини на клітини нейробластами людини IMR-32 та миші N1E-115 проводили замінов

звичайного для певної лінії клітин середі культивування на таке, що містило інтерферон в концентрації 1000 од. акт./мл або 2-5A в потрібній концентрації. Середовище змінювали через добу після пасажу клітин. Кожні три доби це середовище замінювали свіжим (як контрольне, так і таке що містило інтерферон або 2-5A). За контрольні клітини приймали ті, що росли в моношаровій культурі в нормальному ростовому середовищі.

При інкубуванні клітин протягом 9 діб (10 діб після пасажу) відбувається збільшення площі клітин, інкубованих з інтерфероном, у порівнянні з контролем, на 131.5%. Зміна середньої сумарної довжини нейритів при цих же термінах інкубування була  $29.1 \pm 5.9$  нм для клітин, що росли в середовищі, яке містило інтерферон та  $15.2 \pm 3.9$  для клітин контролю. Достовірної різниці в довжині нейритів цих двох груп клітин на ранніх термінах інкубування не спостережали. В той же час площа поверхні клітин, інкубованих з інтерфероном (44 клітини) на 56% перевищувала площу поверхні клітин контролю (38 клітин) вже протягом першої доби інкубування.

Аналіз іонних струмів клітин IMR-32 показує, що через 24 години інкубування з  $\alpha 2$  інтерфероном людини (25 клітин) відбувається достовірне збільшення, у порівнянні з клітинами контролю (17 клітин), густини чутливого до дії ТТХ натрієвого струму на 250%. При цьому же терміні інкубування ми не спостережали суттєвих змін кальцієвої провідності клітин. На більш тривалих термінах культивування ми не мали змоги провести стабільне вимірювання трансмембранних іонних струмів, що пов'язано із значним погіршенням якості клітинної мембрани при культивуванні клітин вказаної лінії більше двох діб після пасажу.

Інкубування клітин нейробластоми миші N1E-115 в культуральному середовищі, яке містило  $\alpha 2$  інтерферон людини не привело до змін в морфологічних та електрофізіологічних параметрах клітин. Відсутність ефекту інтерферону на клітини цієї лінії ми пов'язуємо з проявом видоспецифічності дії інтерферону.

Культивування клітин нейробластоми IMR-32 протягом 24 годин в культуральному середовищі, що містило 2',5'АраРА, не привело до суттєвих змін морфологічних параметрів клітин. В той же час таке інкубування (19 клітин) привело до зміни, у порівнянні з контролем (9 клітин), густини натрієвого струму, подібної до такої, що відбувається при дії на клітини цієї лінії  $\alpha 2$  інтерферону людини. Так, густина натрієвого струму контрольних клітин була  $2.9 \pm 0.8$

ПА/ПФ, а, інкубованих в присутності 1 мкМ 2-5А -  $6.6 \pm 1.4$  ПА/ПФ. При інкубуванні клітин нейробластами миші N1E-115 в культуральному середовищі, що містило  $2',5'$ АРА відбувалась зміна головних параметрів морфологічного диференціювання, що свідчить про індукцію нейронального диференціювання. Так культивування клітин протягом 8 діб у середовищі, що містило 2-5А, проводило до дозо-залежного зростанню довжини нейритів. Середня сумарна довжина нейритів у клітин, що мали відростки, в групі контролю була  $39.8 \pm 12.8$  нм (112 клітин), у клітин, що культивували в середовищі, що містило 1 мкМ 2-5АРА  $206.4 \pm 28.9$  нм (162 клітини), 0,01 мкМ 2-5АРА -  $152.0 \pm 51.9$  нм (48 клітин). На той же час не відбувалось достовірної зміни площі профілю соми як у клітин без нейритів так і клітинах, що не мали їх.

У клітин з відростками з часом збільшується густина натрієвого струму як в клітинах контролю, так і в клітинах, які інкубувались у присутності 2-5А. Одночас, в останній групі клітин густина струму зростала більш швидко. В клітинах, які не мали нейритів, при культивуванні в присутності 1 мкМ 2-5АРА вже через 24 години інкубування спостережали збільшення, у порівнянні з контролем, густини натрієвого струму в 1.27 рази. При більш тривалих термінах культивування в клітинах без нейритів, в контрольних групах, та в групах, що досліджувались, спостережали зменшення густини натрієвого струму.

При культивуванні клітин N1E-115 в вищезгаданих умовах ми не зафіксували змін густини кальцієвого струму, що має низький поріг активації.

Щоб відповісти на питання про роль кальцієвих каналів на процес морфологічного диференціювання клітин N1E-115 ми провели дослідження, в яких використовували блокатор кальцієвих каналів верапаміл, та/або культивування клітин в умовах хронічної деполаризації плазматичної мембрани (культивування в середовищі, що містило 25 мМ КСl).

Інкубування клітин в присутності верапамілу в концентрації 1 мкМ протягом 48 годин викликало значне підсилення ознак морфологічного диференціювання. Спостерігали достовірне, що до клітин контрольної групи (101 клітина), зростання (94 клітини) сумарної довжини нейритів та площі поверхні соми. На відміну від дії верапамілу, інкубування клітин в умовах хронічної деполаризації клітинної мембрани, викликаной підвищенням

концентрації KCl в інкубаційному середовищі до рівня 25 мМ викликало пригнічення морфологічного диференціювання клітин. Спостерегали зменшення росту нейритів та площі соми (89 клітин).

Культивування клітин в середовищі, що містило верапаміл в значно більшій концентрації (100 мкМ) пригнічувало не тільки процес диференціювання, а й на функціонування клітин в цілому, вони зменшувались в розмірах, набували кулеподібну форму і не мали нейритів (59 клітин).

Аналіз кальцієвих струмів виявив, що у всіх групах клітин, незалежно від термінів культивування та довжини нейритів, був зафіксований тільки LVA - компонент кальцієвого струму (струм, що має низький поріг активації).

При інкубуванні клітин нейробластоми N1E-115 протягом 48 годин з верапамілом в концентрації 1 мкМ (9 клітин) відзначали зростання, в порівнянні з контролем (14 клітин), густини LVA - струму. Хронічна деполаризація мембран, викликана підвищенням концентрації зовнішньоклітинного калію (25 мМ KCl) викликала зменшення густини LVA - струму (5 клітин), а в разі інкубування клітин в присутності як 25 мМ KCl, так і 1 мкМ верапамілу густина струму практично не відрізнялась від контролю (7 клітин).

#### Обговорення результатів.

##### Вплив інтерферону та 2-5A на натрієві струми.

При проведенні досліджень іонних струмів клітин нейробластоми IMR-32 ми вперше провели детальний аналіз швидкого натрієвого струму в мембранах клітин цієї лінії. Натрієві канали в клітинах нейробластоми людини IMR-32 за своїми характеристиками найбільш близькі до натрієвих каналів нейробластоми миші N1E-115. Паралельне вивчення натрієвого струму в клітинах цих двох ліній дозволило простежити прояв видоспецифічності дії інтерферону. Так, якщо додати його у зовнішньоклітинний розчин, то виникає видоспецифічне збільшення амплитуди натрієвого струму. Отриманий результат добре узгоджується з даними літератури.

Вважають, що дія інтерферону обумовлена, головним чином, швидким запуском системи синтезу олігоаденілатів. Проте, відомий механізм дії олігоаденілатів дійсний тільки для фосфорильованих форм олігоаденілатів. Добре відомо, що й дефосфорильовані (корові) олігоаденілати мають високу антивірусну активність. При дії інтерферону *in vivo* зафіксоване значне (на 2-3 порядки)

підвищення концентрації корових форм олігоаденілатів в крові. Проте сам механізм дії корових олігоаденілатів остаточно невідомий. В наших експериментах введення корової форми олігоаденілатів 2',5'ArArA до внутрішньопіщоточного розчину підсилювало натрієвий струм в мембранах клітин нейроblastomi миші N1E-115 і людини IMR-32. Подібний ефект спостерігали під впливом  $\alpha 2$  інтерферону людини на натрієвих каналах клітин нейроblastomi людини IMR-32.

Аналіз літератури показує, що внутрішньоклітинні процеси, які змінюють натрієвий струм, пов'язані з фосфорилуванням/дефосфорилуванням певних груп білкової структури натрієвого каналу. Відомо також, що інтерферон активує в клітинах ряд специфічних кіназ. Тому ми можемо припустити, що ефект 2',5'ArArA пов'язаний саме з процесами, що призводять до фосфорилування/дефосфорилування натрієвого каналу.

#### Дія 2-5A на кальцієві струми

Зміна кальцієвої провідності веде до відповідної зміни внутрішньоклітинної концентрації важливого посередника багатьох клітинних процесів - іонів кальцію. Навіть незначні коливання внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію можуть значно вплинути на метаболізм клітини.

Відомий тільки один шлях збільшення амплітуди кальцієвого струму, що має високий поріг активації: дія на G протеїни або через цАМФ - залежні протеїнкінази, або через протеїнкіназу C. Однак, ці процеси проходять тільки в присутності іонів магнію. В нашому випадку збільшення кальцієвого струму спостерігається навіть в умовах зв'язування іонів магнію при додаванні до внутрішньоклітинного розчину EDTA. Відомо також, що під дією інтерферону в клітинах активується декілька специфічних протеїнкіназ, активність яких залежить від іонів марганцю. Цілком можливо, що саме ці марганець-залежні протеїнкінази в кінцевому результаті збільшують імовірність перебування каналів в відкритому стані. В підтримку такого припущення говорить і той факт, що ми зареєстрували зміну іонної провідності тільки тих каналів, функціональний стан яких залежить від фосфорилування/дефосфорилування їх білкової структури. В той же час ми не виявили впливу корових олігоаденілатів на кальцієвий струм, що має низький поріг активації. Саме цей тип каналу що

перебувати у відкритому стані не потребує обов'язкового фосфорилування.

Слід відмітити значну активність штучно синтезованого олігоаденілата - 2',5'АрапероухА, який надзвичайно стійкий до дії фосфодіестераз 1 тому може дуже сильно впливати на клітини.

Ми використовували іонні канали, як досить добре вивчені системи, що чутливо реагують на зміну багатьох клітинних процесів та які, по суті, є індикаторами функціонального стану клітини. Інтерферон не є єдиним фактором, що активує синтез 2-5 олігоаденілатів. Тому можна припустити, що фізіологічно олігоаденілати активують різноманітні процеси, навіть в клітинах, які не чутливі до дії інтерферону.

**Морфологічне диференціювання клітин, індуковане інтерфероном або 2-5 олігоаденілатами та його зв'язок з експресією іонних каналів.**

Відомо, що  $\gamma$ -інтерферон стимулює морфологічне диференціювання різних типів нейронів. Своїми дослідженнями ми довели індукцію диференціювання клітин нейробластоми людини IMR-32  $\alpha 2$ -інтерфероном людини. Вперше виявили вплив олігоаденілатів на морфологічне диференціювання клітин нейробластоми людини IMR-32 та миші N1E-115 2-5 олігоаденілатами. Оскільки інтерферон при дії на клітини активує синтез 2-5 олігоаденілатів, природньо припустити що індукція диференціювання клітин під впливом інтерферону відбувається саме через систему 2-5 олігоаденілатів.

Ми провели порівняльний аналіз змін морфологічних ознак диференціювання з отриманими даними по експресії натрієвих та кальцієвих каналів. В перші години дії 2-5 олігоаденілатів на клітини нейробластоми миші N1E-115 спостерігається зміна натрієвого струму. Аналогічний ефект спостерігається під впливом  $\alpha 2$ -інтерферону людини та 2-5 олігоаденілатів на клітини нейробластоми людини IMR-32.

Клітини, що мають довгі відростки 1, відповідно, знаходяться на більш пізніх фазах диференціювання, практично не реагують на інкубування у середі культивування, що містить 2-5 олігоаденілати. При більш тривалих термінах культивування значно зменшується ефективність дії 2-5 олігоаденілатів, а густина швидкого натрієвого струму, як в мембранах клітин інкубованих в присутності 2-5 олігоаденілатів, так і в мембранах клітин контрольної групи, майже не відрізняється. Це свідчить, що саме 2-5 олігоаденілати на

ранній стадії дії інтерферону "запускають" в клітинах процеси, пов'язані з індукцією диференціювання. Виявлене в цьому випадку збільшення густини натрієвого струму можливо пов'язане не з прямим дією 2-5 олігоаденілатів, а є вторинним ефектом, обумовленим збільшенням довжини нейритів. Аналіз літератури та власні дослідження дозволяють вважати, що збільшення густини натрієвого струму є вторинною ознакою нейронального диференціювання.

Так само зміна густини кальцієвого струму, що має низький поріг активації, яка спостерегається при різних методах індукції диференціювання, не є необхідною умовою початку морфологічного диференціювання. Головним моментом, можливо, є відомості про "вузьке вікно" в діапазоні змін концентрацій внутрішньоклітинного кальцію, в якому тільки і можливе морфологічне диференціювання. Зміна внутрішньоклітинної концентрації кальцію може відбуватися різними шляхами, а саме: за рахунок роботи іонних каналів, і за допомогою внутрішньоклітинних систем, що регулюють концентрацію кальцію.

Відомо, що інтерферон змінює концентрацію іонів кальцію в клітині, сприяючи проникненню його іззовні та впливаючи на внутрішньоклітинні системи регулювання кальцію. Так само можна пояснити дію на морфологічне диференціювання різних блокаторів кальцієвих струмів та деяких інших речовин, що впливають на роботу каналів. Так інкубування клітин N1E-115 в середі культивування, що містило 25 мМ KCl приводило до пригнічення морфологічного диференціювання клітин. Цей ефект, в згаданих умовах можна пояснити постійною інактивцією кальцієвих каналів. Застосування верапамілу - блокатора кальцієвих каналів, що мають високий поріг активації, стимулювало диференціювання. В досліджуваних клітинах був повністю відсутній кальцієвий струм, що мав високий поріг активації. Дією на цей струм можна було б пояснити ефект верапамілу. Відомо, яка в клітинах серця верапаміл підвищує внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію, що викликає гіперполяризацію клітин. В нашому випадку такий ефект може знімати інактивцію кальцієвих каналів, та, як слідство цього, змінювати внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію. При інкубуванні клітин в середовищі, яке містить і 25 мМ KCl, і 1 мкМ верапамілу, тобто факторів, що викликають протилежні ефекти на мембранний потенціал, практично не змінюються ні морфологічні, ні електрофізіологічні параметри клітин, у порівнянні з відповідними

параметрами клітин контрольної групи.

### Висновки

1. Досліджена дія  $\alpha 2$ -інтерферону людини та різних форм олігоаденілатів на іонні струми в мембранах клітин трьох нейрональних ліній: IMR-32, N1E-115 та GN3.
2. Виявлено, що аплікація  $\alpha 2$ -інтерферона людини на клітини нейробластоми людини IMR-32 та миши N1E-115 викликає видоспецифічне збільшення амплітуди натрієвого струму. Подібне збільшення амплітуди натрієвого струму в мембранах клітин лінії IMR-32 і лінії N1E-115 викликало додавання до внутрішньоклітинного розчину 2-5ArArA - корової форми олігоаденілатів. Отримані результати дозволяють припустити, що саме через олігоаденілати інтерферон впливає на натрієвий струм.
3. Доведено, що внутрішньоклітинне введення 2-5ArArA викликало підсилення кальцієвого струму, який має високий поріг активації, не активується в клітинах лінії GN3, та не діє на кальцієвий струм, що має низький поріг активації в клітинах лінії N1E-115 і GN3.
4. Досліджено механізм дії корових олігоаденілатів на натрієві та кальцієві струми. Доведено, що стимулююча дія 2-5ArArA має зворотню залежність від внутрішньоклітинної концентрації іонів магнію. Отримані результати дають можливість припустити, що ефект дії олігоаденілатів на потенціалкеровані іонні струми пов'язаний з активністю протеїнкіназ, які активуються інтерфероном.
5. Кальцієві канали можна використовувати, як індикатор ефективності дії різних форм олігоаденілатів.
6. Доведено, що інкубування клітин нейробластоми людини IMR-32 та миши N1E-115 в середині культивування, яка містила  $\alpha 2$ -інтерферон людини або 2-5ArArA, викликало видоспецифічне підсилення морфологічного диференціювання клітин.
7. Аналіз іонних струмів в клітинах, що перебувають на різних етапах морфологічного диференціювання виявив, що підсилення експресії натрієвих та кальцієвих каналів відбувається тільки на початку інкубування. При більш тривалих термінах інкубування

підсилення морфологічного диференціювання не завжди корелює зі зміною експресії іонних каналів.

8. Отримані результати дозволяють вважати, що механізм дії системи олігоаденілатів на клітини є багатостадійним процесом, в якому суттєву роль відіграють корові форми олігоаденілатів. Запропонована схема дії інтерферона на клітини.

**Матеріали дисертації опубліковані :**

1. Действие интерферона  $\alpha_1$  на натриевые каналы клеток нейробластомы человека IMR-32. С.В.Вятченко-Карпинский, Н.Х.Погорелая, I.C.Магура, O.M.Рожманова, Г.Х.Мацука, O.Ф.Сенюк. Биологические мембраны, т.9., N 10-11, 1992, с. 1159-1160.

2. Дія рекомбінантного інтерферону  $\alpha_2$  на натрієві канали клітин нейробластоми людини IMR-32. I.C.Магура, С.В.Вятченко-Карпінський, Н.Х.Погорелая, O.M.Рожманова, Г.Х.Мацука, O.Ф.Сенюк. Клітинні та молекулярні механізми розвитку патологічних процесів. Тези доповідей Пленуму науково-медичного товариства патофізіологів України, 23-25 вересня 1993 р., м. Львів. с. 21.

3. Вплив верапамілу на густину кальцієвого низькопорогового струму та параметри морфологічного диференціювання в клітинах нейробластоми миші N1E-115. С.В.Вятченко-Карпінський, Н.Х.Погоріла, М.В. Седова, O.Є. Тохтуєв. Тези доповідей XIV з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. I.П. Павлова, Київ, 1-4 листопада 1994 р., с. 6-7.

4. Dephosphorylated oligoadenylates modulates NVA calcium currentes in GH3 cells. Kostyuk P.G., Viatchenko-Karpinski S.V., Sedova M.B., Teslenko V.I. Нейрофізіологія. 1994, т. 26, 6, с.1-3.

5. Effect of "core" 2',5' - oligoadenylates on the phosphorylation - dependent calcium channels in GH3 cells. P.G.Kostyuk, A.V.Kozlov, Z.Yu.Tkachuk, S.V.Viatchenko-Karpinski, M.B.Sedova and V.I.Teslenko. Український біохімічний журнал, 1995, т. 67, 1, с. 26-32.

6. Про можливу участь інтерферонів у патогенезі нервових клітин у хворих на СНІД. Костюк П., Магура I., Вятченко-Карпінський С., Рожманова O. Тези доповідей першої національної науково-практичної конференції з проблем ВІЛ/СНІД з міжнародною участю, Київ, 24-27 січня 1995р., с. 60.

7. Human  $\alpha_2$  interferon and "core" oligoadenylates modulate voltage-dependent ionic currentes in IMR-32, N1E-115 and GH3 cell lines. Viatchenko-Karpinski S.V., Sedova M.B., Pogorelaja N.H., Hudorajeva A.M., Mahailopulo I.A., and Teslenko V.I.. Тези наукової конференції, присвяченої 100-річчю з дня організації кафедри фізіології Львівського медичного інституту. Львів, 10-13 жовтня 1995.

8. Інтерферон  $\alpha 2$  та олигоденілати підсилюють морфологічне диференціювання клітин нейроblastами та впливають на густину потенціалкерovanного натрієвого струму. Вятченко-Карпинський С.В., Погоріла Н.Х., Михайлопуло І.С., Рожманова О.М., Магура І.С. Тези наукової конференції, присвяченої 100-річчю з дня організації кафедри фізіології Львівського медичного інституту. Львів, 10-13 жовтня 1995.

9. Влияние верапамила на морфологическую дифференцировку и плотность низкочастотного кальциевого тока в клетках мышечной нейроblastомы N1E-115. Вятченко-Карпинский С.В., Погорелая Н.Х., Тохтуев А.Е., Седова М.Б. Нейрофизиология. 1995, т. 27, 2. В печати.

10. Морфологическая дифференцировка клеток нейроblastомы линий IMR-32 и N1E-115 и модуляция ионных каналов: вызванные  $\alpha 2$  интерфероном и олигоденілатами. Вятченко-Карпинский С.В., Погорелая Н.Х., Магура І.С., Рожманова О.М., Квасюк В.И.\*, Михайлопуло І.А\*. Нейрофизиология. 1995, т. 27, 2. В печати.

Human  $\alpha 2$  interferon and 2',5'-oligoadenylates (2-5A) action on calcium and sodium currents and morphological differentiation of IMR-32, N1E-115 and GH3 cell lines were investigated.

We studied the cellular mechanism of interferon and 2-5A action. Addition of human interferon  $\alpha 2$  into the bath solution (600 uA/ml) induced an increase of the magnitude of the sodium current in the membranes of human neuroblastoma IMR-32 cells (151.1 $\pm$ 28.9%), but didn't cause any effect on sodium current in mouse neuroblastoma N1E-115 cells.

The same effect was observed as in IMR-32 as in N1E-115 cells after addition 2',5'ApApA form of core 2-5A into the pipette solution (0.1-10 mkM).

Addition of 10 mkM 2',5'ApApA into the pipette solution induced an increase of HVA (high voltage activated) calcium current. In 10 min after the whole-cell configuration was established, the current magnitude was enhanced by about two-fold as compared with that observed on the second min. High concentration of  $Mg^{2+}$  (5mkM) in the pipette solution blocked effect. 2',5'ApA and 3',5'ApApA oligoadenylates and products of 2',5'A hydrolysis, adenosin and AMP, did not change the value of HVA current. Chemically modified analog of 2',5'ApApA - 2',5'ApApepoxyA, is the most stable oligoadenylate to the phosphodiesterases action. Addition of 2',5'ApApepoxyA into the pipette solution caused a effect smaller than 2',5'ApApA did.

The morphological differentiation of neuroblastoma IMR-32 and N1E-115 cells under interferon  $\alpha 2$  and 2-5ApApA influence were investigated. It was found that human interferon  $\alpha 2$  induce morphological differentiation in IMR-32 cells and 2-5ApApA induce morphological differentiation in IMR-32 and N1E-115 cells. Reliable correlation between morphological criterions of the nerve cells (somatic size and neurite length) and sodium current density during interferon  $\alpha 2$  and 2-5ApApA has been found.

It was also shown that verapamil in concentration 1 mkM promote morphological cell differentiation. In so going increased the density of low-threshold calcium current (LVA-current). It was depression of the neurite outgrowth and decrease of the cell area if the cells were incubated with verapamil in 100 mkM concentration. At the same time a drastic decrease of the T-current density was observed.

Исследовалось действие человеческого  $\alpha 2$  интерферона и дифосфорилированных ("коровых") 2',5'-олигоаденилатов (2-5A) на кальциевые и натриевые токи и морфологическую дифференцировку клеток линий IMR-32, N1E-115 и GH3.

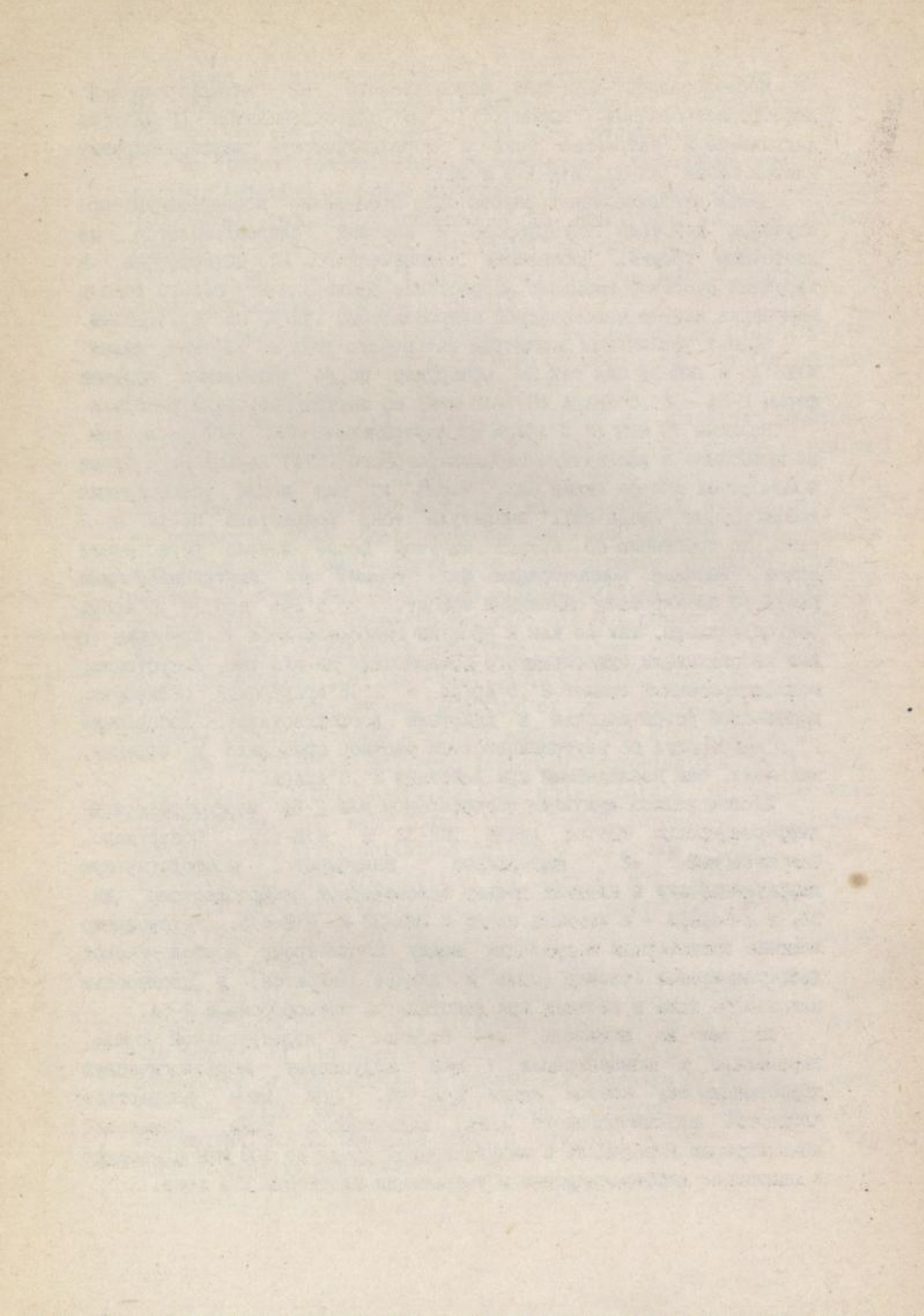
Целью представленной работы было проведение исследований по изучению действия интерферона и коровых олигоаденилатов на клеточном уровне. Добавление человеческого  $\alpha 2$  интерферона в наружный раствор вызывало возрастание амплитуды натриевого тока в мембранах клеток человеческой нейробластомы IMR-32 на  $51.1 \pm 28.9\%$ .

Эффект увеличения амплитуды натриевого тока в клетках линий N1E-115 и IMR-32 был так же обнаружен после добавления коровой формы 2-5A - 2',5'ArArA (0.1-10 мкМ) во внутрипипеточный раствор.

Наличие 10 мкМ 2',5'ArArA во внутрипипеточном растворе так же приводило к увеличению высокопорогового (HVA) кальциевого тока в мембранах клеток линии GH3. Через 10 мин после установления конфигурации "whole-cell" амплитуда тока возрастала почти в 2 раза, по сравнению со второй минутой после начала регистрации токов. Высокая концентрация  $Mg^{2+}$  (5 мкМ) во внутрипипеточном растворе блокировало описанный эффект. 2',5'ArA and 3',5'ArArA олигоаденилаты, так же как и продукты гидролиза 2-5A - аденобин и АМФ не оказывали существенного воздействия на HVA ток. Искусственно модифицированный аналог 2',5'ArArA - 2',5'ArArероухА отличается повышенной устойчивостью к действию дософодиастераз. Добавление 2',5'ArArероухА во внутрипипеточный раствор приводило к эффекту, меньшему, чем наблюдаемый при действии 2',5'ArArA.

Исследовалась индукция интерфероном или 2-5A морфологической дифференцировки клеток линий IMR-32 и N1E-115. Обнаружено, человеческий  $\alpha 2$  интерферон индуцирует морфологическую дифференцировку в клетках только человеческой нейробластомы IMR-32, а 2-5ArArA - в клетках линий IMR-32 и N1E-115. Установлено наличие достоверной корреляции между параметрами морфологической дифференцировки (размер сомы и длина нейритов) и плотностью натриевого тока в клетках при действии  $\alpha 2$  интерферона и 2-5A.

Мы так же показали, что наличие в культуральной среде верапамила в концентрации 1 мкМ индуцирует морфологическую дифференцировку клеток линии N1E-115. При этом возрастает плотность низкопорогового (LVA) кальциевого тока. Изменение концентрации верапамила в инкубационной среде до 100 мкМ приводит к депрессии дифференцировки и уменьшению плотности LVA тока.



43120

AB 33.187