

О.И. Малюшенко

ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ НА ФОНЕ СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

ФГУН Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций Роспотребнадзора

Современная стратегия борьбы с вирусными инфекциями человека предполагает воздействие лекарственных соединениями на наиболее уязвимые фазы в репликационном цикле вируса, повышение уровня естественной устойчивости организма путем стимуляции неспецифических факторов защиты, вакцинации или использования иммунокорректирующей терапии.

В связи с этим определенным интерес представляют данные о последствиях комбинированного воздействия лекарственных средств с разным механизмом действия на уровне клетки, в частности, оценка одновременного влияния на клетку нескольких препаратов при отсутствии выраженного цитотоксического эффекта и отдаленная реакция на воздействие данных лекарственных препаратов.

Морфологические изменения клеток *in vitro* могут быть одним из важных критериев «качества» схем противовирусной терапии, так как лекарственные препараты становятся внешним фактором, изменяющим условия взаимодействия клеточного и вирусного геномов.

В работе представлены данные по изменению параметров митотического режима стандартной клеточной культуры, возникающие в результате сочетанного введения лекарственных препаратов, используемых при лечении герпетической инфекции.

Материалы и методы. *Культура клеток.* В ходе выполнения исследований была использована перевиваемая линия клеток Л-41 КД/84 (А.С.№1331061 от 26.11.85) [6], полученная в лаборатории клеточных культур ЕНИИВИ в 1984г. Культура обладает морфологической однородностью и высокой пролиферативной активностью; сохраняет стабильность культуральных и морфологических характеристик, что обеспечивает стандартность проводимой серии экспериментов. Средой роста является смесь равных количеств сред 199 и Игла с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (КРС) без антибиотиков. Среда поддержания – то же без КРС.

Био- и химиопрепараты. В качестве препаратов использовали ацикловир – эталонное противогерпетическое средство; реальдирон – синтетический альфа-интерферон и неовир – индуктор интерферона.

Для исключения токсического влияния на клетки испытуемых препаратов по показателям пролиферативной активности были рассчитаны их максимально переносимые дозы (МПД) – доза вещества, не оказывающая видимого цитотоксического действия на клетки в культуре [4]. Для ацикловира МПД составила 0,002, неовира – 0,0125 мг/мл, реальдирина – 0,1 МЕ/мл.

Метод морфологического анализа. Культуру клеток выращивали на предметных стеклах в 250-мл флаконах.

Доза посадки составляла 120 тыс.кл/мл. При посадке в клеточную суспензию были однократно введены препараты в МПД. Культуру инкубировали при 37°C в течение четырех пассажей. Через 24, 48, 72, 96 ч с момента посадки на первом и четвертом пассаже производили забор стекол в стерильных условиях. Стекла отмывали от среды в растворе Хенкса, фиксировали в 96% этиловом спирте в течение 30 мин и оставляли в 70% этаноле до окраски. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике и заключали в балъзам.

Результаты исследования и их обсуждение. Интактная культура перевиваемых лейкоцитов человека Л-41-КД/84 образует монослой, состоящий из клеток полигональной формы с крупными ядрами округлой формы. Цитоплазма гомогенная, мелкозернистая, ядра содержат 2-4 ядрышка. Границы между клетками хорошо выражены (рис.1а). Монослой формируется на третьи сутки. По мере его уплотнения клетки образуют “завихрения” по направлению к очагам пролиферации.

Митотическая активность контрольной культуры в данной серии экспериментов изменялась от 68,6‰ к 48 ч до 50,2‰ через 96 ч роста (рис.2а). Соотношение фаз митоза оставалось уравновешенным: с коэффициентом фаз 1,6-1,5 в период подъема митотической активности и до 1,0 при снижении числа митозов. Максимальное число патологических митозов (12,7-12%) отмечено на фоне максимальной митотической активности (24-48 ч инкубации). Разница в количестве аномалий, выявленных за время наблюдения, составила 2%. Наиболее часто в контроле встречалась патология метафаз типа отставания хромосом - 4,0%, полых - 2,4% и трех групповых - 1,2%.

В данной работе принято во внимание, что широко используемые в практике противовирусные препараты не оказывают острого токсического действия на организм. Поэтому на первом этапе были подобраны нетоксичные дозы препаратов (МПД). Расчет показал, что они соответствуют разовым («теоретическим») концентрациям при условии равномерного распределения лекарства среди всех биологических жидкостей организма, весе возможного пациента 60 кг, а жидкостном компартменте 70% [3].

Несмотря на отсутствие сдвигов пролиферативной активности клеток при использовании МПД-препаратов митотический режим культуры изменялся за счет повышения процента аномалий митоза, нарушения соотношения фаз и динамики митотической активности, по сравнению с контролем. При этом влияние комплекса препаратов на показатели митоза зависело от характера воздействия на митотическую активность культуры каждого из препаратов в отдельности. Суммация эффектов влияния на морфологию клеток была выявлена для всех препаратов.

Так, при воздействии только ацикловиром или реальдирином наблюдалось разнонаправленное (стимуляция – угнетение) действие на митотическую активность. В то же время, у клеток, обработанных этими препаратами в комплексе (ацикловир+реальдирон), характер изменения митотической активности приближался к контрольным значениям (рис.2а).

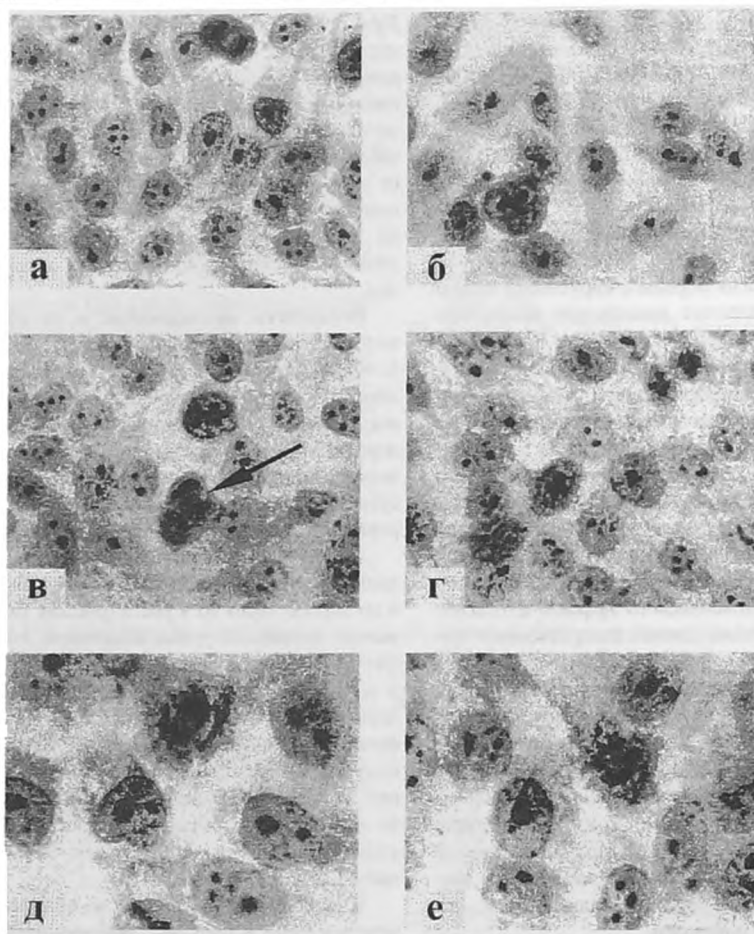


Рис 1. а) Контрольная культура клеток Л-41/КД-84; б-г) Патологические формы митозов в культуре Л-41/КД-84, обработанной неовиром в сочетании с реальдироном; б) Трехполосная метафаза; в) Трехполосная ранняя телофаза; г) Четырехполосная метафаза; д-е) Патологические формы митозов в культуре Л-41/КД-84, обработанной ацикловиром в сочетании с неовиром и реальдироном; д) Отставание хромосом в анафазе; е) Полая метафаза. Окраска гематоксилин-эозином: а-г х 400, д,е х 600

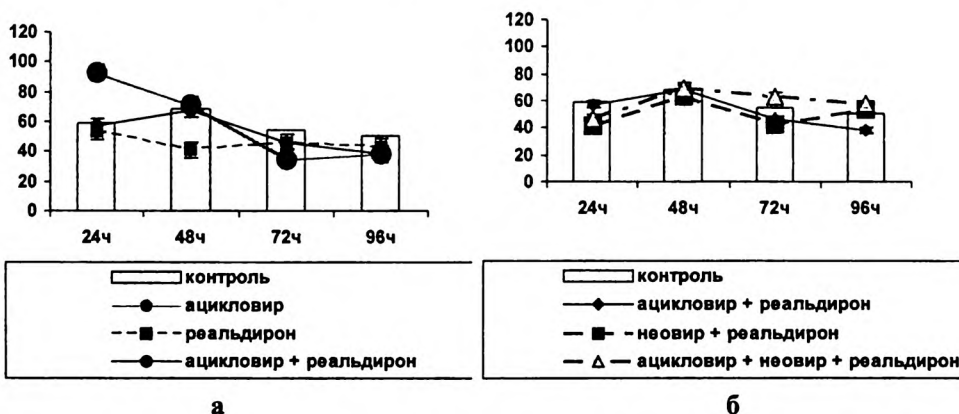


Рис. 2. а - Динамика митотической активности культуры клеток Л-41/КД 84, обработанной ацикловиром и реальдироном, в зависимости от варианта сочетания препаратов; б - Динамика митотической активности культуры клеток Л-41, обработанной ацикловиром, неовиром, реальдироном в зависимости от варианта сочетания препаратов.

Неовир и реальдирон, введенные в культуру раздельно, оказывали однонаправленное угнетающее процессы деления клеток действие. После однократного введения сочетания данных препаратов на первом пассаже отмечено двухволновое снижение митотической активности на 20-30% через 24 и 72 ч наблюдения (рис.3). Кроме того, было спровоцировано увеличение числа аномально делящихся клеток, преимущественно в фазе раннего митоза. Увеличилось число отстававших хромосом в метафазе, количество многополосных мета- и анафаз (рис.1б, г). К 96 ч был отмечен рост аномалий анафаз - отстававших хромосом, неравномерных анафаз и появление многополосных телофаз (рис 1в).

Дополнительное введение ацикловира в культуру, обработанную неовиром и реальдирином, вызвало менее выраженное количественно (максимум – 14,3 против 17,8% при введении неовира с реальдирином), но более разнообразное по формам аномальное деление. На рис.1д.е представлены отстаивание хромосом в анафазе, полая метафаза. Изменение параметров митотической активности показано на рис.2б.

Для получения более полной оценки воздействий препаратов на клетки важны данные об обратимости либо необратимости неблагоприятных эффектов и способности клеток восстанавливать свои первоначальные функции в чистой питательной среде, так называемый recovery test [7]. Международной программой методов исследования токсичности *in vitro* для оценки долговременной токсичности принята экспозиция с токсикантом 5 суток и более. Предусматривается как постоянная инкубация с препаратом, так и несколько повторных введений его в тест-систему. В данном опыте изучали влияние препаратов на митотический режим клеток через три пассажа на четвертом после однократного введения препаратов. Установлено, что сочетание «неовир + реальдирон» стало фактором, препятствующим размножению культуры (рис.3). Зафиксировано резкое снижение митотической активности в течение всего четвертого пассажа. Митотический индекс к 48 ч составил 40% от контроля. До 30% возросло количество патологических митозов, коэффициент фаз через 96 ч увеличился до 2. Встречаемость отстававших хромосом, 3-полосных и моноцентрических метафаз в несколько раз превысила контрольные значения.

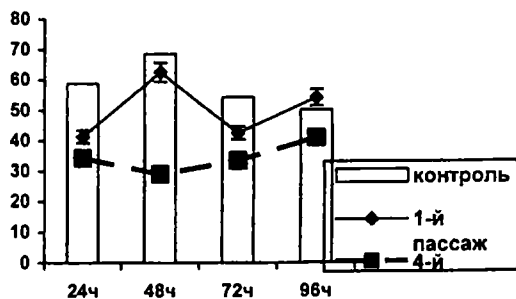


Рис.3. Динамика митотической активности культуры клеток Л-41 на 1-м и 4-м пассажах после однократной обработки неовиром и реальдирином

Влияние других сочетаний препаратов на митотическую активность культуры на четвертом пассаже менее выражено.

Выводы

Полученные результаты изучения влияния препаратов на митотический режим клеток неинфицированной культуры представляются нам важными. В большинстве случаев морфологические изменения при воздействии малых доз химических препаратов носят обратимый характер, и культура восстанавливается при прекращении введения веществ. Однако следует учитывать, что риск развития патологии возрастает при увеличении времени воздействия препаратов, присоединении дополнительных факторов, нарушающих функциональное состояние клеточной системы. Отклонение параметров митоза на 30% и более от контрольных значений можно рассматривать как критический момент перестройки нормальной клеточной популяции в направлении патологического процесса. В соответствии с законом «перехода количественных изменений в качественные», изменение качества объекта происходит тогда, когда накопление количественных изменений достигает так называемой «границы меры», составляющей относительно стандартной точки отсчета (нормы) 1/3 количества элементов объекта [5]. Поэтому схемы сочетанного использования препаратов, например, «неовир+реальдирон» в настоящей работе, вызывающие существенное угнетение митотической активности тест-культуры на фоне роста патологии деления, требуют более глубокого изучения до начала их практического использования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Н.Д. Комбинированная терапия герпесвирусной инфекции (экспериментальные и клинические данные) [Текст] / Н.Д. Львов, Е.О. Самойлович, И.Ф. Баринский // Вопросы вирусологии. - 1992. - №1. - С.8-15.
2. Марченко Л.А. Современные подходы к диагностике и лечению генитального герпеса [Текст] / Л.А. Марченко // Проблемы репродукции. - 1997. - Т.3, №1. - С.28-33.
3. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. [Текст] / Р. Фрешни. - М.: Мир, 1989. - 333с.
4. Цитотоксическое действие химических веществ, содержащихся в виде примесей в некоторых медицинских иммунобиологических препаратах [Текст] / Г.П. Червонская, А.Т. Кравченко, В.Ф. Рунова и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1988. - №12. - С.85-90.
5. Количественные аспекты анализа многокомпонентной системы при переходе ее в качественно новое состояние [Текст] / И.П. Шабалкин, А.С. Ягубов, П.И. Шабалкин и др. // Вестник РАМН. - 2004. - №12. - С.46-48.
6. Штамм перевиваемых лейкоцитов человека Л-41 КД/84, используемый для культивирования энтеровирусов. А.С. SU 1331061 А. Свердловский научно-исследовательский институт вирусных ин-

фекций. Глинских Н.П., Авдеева В.Н., Зусман Ф.Я. и др. - №3981708/28-13; Заявл. 26.11.85.

7. Novel advanced in vitro methods for long-term toxicity testing [Text] / W. Pfaller, M. Balls, R. Clothier et al. // ATLA. - 2001. - V.29, №4. - P.393-426.

И.А. Поберий¹, К.К. Стяжкин¹,
А.Н. Забокрницкий¹, Н.А. Забокрницкий²

КОНЦЕПЦИЯ МИКРОБНОГО ФАКТОРА СРЕДЫ: САПРОФИТЫ И СИМБИОНТЫ В ЭВОЛЮЦИИ СИСТЕМ ГОМЕОСТАЗА ЧЕЛОВЕКА И НА ЭТАПЕ СОВРЕМЕННЫХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ ЭКОСФЕРЫ

¹ Центр военно-технических проблем биологической защиты НИИ микробиологии МО РФ, г. Екатеринбург
² Уральская государственная медицинская академия

На рубеже XX-XXI вв. в мире микробов определялись и набирают силу неблагоприятные процессы, развитие которых прогнозировали ранее И.В. Давыдовский (1956), А.Ф. Билибин (1967), В.А. Кордюм (1983) и характеризовали как потенциальную угрозу цивилизации от ускорения процесса эволюции микроорганизмов под воздействием антропогенного преобразования среды обитания живых существ [1, 3, 4].

Действительно, в последнее время значимо возросла эпидемическая роль условно патогенных микробов, на арену возвратились "забытые старые" инфекции, причем в клинически измененном виде, а главное, появляются новые вирусные и микробные патогены, вызывающие тяжелые инфекционные заболевания, против которых иммунобиологические факторы защиты организма человека и существующие в арсенале современной медицины лечебно-профилактические средства оказываются недостаточно эффективными [2, 5, 6].

Поэтому можно полагать, что в условиях глобального преобразования экосферы происходят события, затрагивающие как микро-, так и макроорганизмы и сопровождающиеся нарушением закрепленного в эволюции равновесия во взаимоотношениях между ними. В частности, антропогенное преобразование среды обитания обусловило ускорение эволюции микробов, причем в данный процесс оказались вовлеченными как патогенные, так и сапрофитные и симбионтные виды, а с другой стороны, и исторически сформировавшиеся системы гомеостаза организма человека, их функции по сохранению иммунологического постоянства внутренней среды, обеспечению резистентности к развитию дисбиозов, инфекционных, соматических, нейро-эндокринных и других видов патологии [1-5, 10-12].

Основываясь на теории так называемого "адаптационного синдрома" Г. Селье (1936), допустимо утверждать, что у значительной части популяции *H. sapiens* в современной преобразующейся среде обитания нарастают дезадаптационные нарушения в функциях основных систем гомеостаза, ответственных за конкретные его секторы [2, 4, 5, 13].

Происходящие в биосфере процессы существенно влияют на сложившиеся в медико-биологических дисциплинах представления, ибо их последствия не "вписываются" в рамки классических концепций эволюции и роли в ней микробов среды, оцениваемой односторонне – преимущественно негативно. Поэтому сегодня является актуальным изучение роли сапрофитных микробов окружающей среды, равно как и симбионтов, в историческом формировании системных взаимоотношений микро- и макроорганизмов, развитии систем и функций гомеостаза организма человека и животных, условиях возникновения патогенов.

На необходимость такого рода исследований указывал еще И.В. Давыдовский: "Чтобы предупреждать болезни необходимо знать закономерности их развития, а эти закономерности уходят не только в глубину индивидуальной жизни, но и в глубь веков, в историю развития человечества" [3].

К аналогичному заключению в наши дни пришли академик РАМН Н.И. Нисевич и соавт., указывающие на потребность переосмысления вопросов микро- и макроэкологии, коэволюции в историческом прошлом и в условиях современной урбанизации экосферы.

Согласно вышесказанному, решение актуальной задачи по совершенствованию лечебно-профилактических мер в условиях усложнившейся эпидемиологической обстановки, роста заболеваемости населения РФ обуславливает потребность изучения в исторической ретроспективе порядка и особенностей формирования взаимоотношений организма человека с миром микробов, как древним облигатным биотическим фактором среды обитания, принимавшим непосредственное участие в развитии с начальных этапов эволюции систем и функций гомеостаза его предков и испытывающим на этапе современных преобразований экосферы определенные подвижки, в том числе и негативные по своей сути, для адекватной коррекции изменений иммуностимулирующего действия со стороны экзогенных сапрофитов среды и эндогенных (симбионтных) микробов [2-6, 15].

Не вызывает сомнений, что современные различия во взаимоотношениях человека с миром микробов, представленным сапрофитами, симбионтами и патогенами, возникли в глубоком прошлом в результате адаптаций и коадаптаций и материальны по своей природе (табл.1). В их основе лежат значимые отличия, с одной стороны, в морфологии и физиологии бактерий и биохимических характеристиках содержащихся в них и экскретируемых наружу физиологически активных микробных субстанций, а с другой стороны, в содержании вызываемых ими в организме иммунобиологических реакций и степени вовлеченности в эти процессы остальных, помимо иммунной, систем гомеостаза.

Эта связь развилась из-за многочисленности и распространенности микробов как одних из наиболее древних, наряду с водорослями, эволюционирующих миллионы лет существ, влияние чуждой информации которых в виде ДНК, РНК, антигенных и неантигенных (прежде всего, полисахаридных) субстанций, синтезированных по инородным программам [7], служило конструктивным фактором (микробным факто-