

3. **Urlaub G., Chasin L.A.** Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. Proc Natl Acad Sci U S A., 1980, 77, 7: 4216–4220.
4. **Milbrandt J.D., Azizkhan J.C., Hamlin J.L.** Amplification of a cloned Chinese hamster dihydrofolate reductase gene after transfer into a dihydrofolate reductase-deficient cell line. Mol Cell Biol., 1983, 3, 7: 1274–1282.
5. **Ozkinay C., Mitelman F.** A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. Hereditas, 1979, 90, 1: 1–4.
6. **Hamerton J.L.** Report of the committee on chromosome markers. Cytogenet Cell Genet., 1976, 16, 1-5: 83–91.
7. **ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**, Shaffer L.G., Slovak M. L., Campbell L. J. (eds); S. Karger, Basel 2009.
8. **Филатов Л.В., Мамаева С.Е.** Стабильность кариотипа двух постоянных линий клеток китайского хомячка — CHO-K1 и V-79. Цитология, 1985, 27, 9: 1031–1038.
9. **Kao F.T., Puck T.T.** Genetics of somatic mammalian cells. IX. Quantitation of mutagenesis by physical and chemical agents. J Cell Physiol., 1969, 74, 3: 245–258.
10. **Deaven L.L., Petersen D.F.** The chromosomes of CHO, an aneuploid Chinese hamster cell line: G-band, C-band, and autoradiographic analyses. Chromosoma, 1973, 41, 2:129–144.
11. **Bravo M.V., Bianchi M.S., Bolzán A.D.** Bleomycin induces delayed instability of interstitial telomeric sequences in Chinese hamster ovary cells. Mutat Res., 2012, 731, (1-2): 133–139.
12. **Cao Y., Kimura S., Itoi T., Honda K., Ohtake H., Omasa T.** Construction of BAC-based physical map and analysis of chromosome rearrangement in Chinese hamster ovary cell lines. Biotechnol Bioeng., 2012, 109, 6: 1357–1367.
13. **Worton R.G., Ho C.C., Duff C.** Chromosome stability in CHO cells. Somatic Cell Genet., 1977, 3, 1: 27–45.
14. **Полянская Г.Г., Абрамян Д.С., Глебов О.К.** Кариотипическая структура клоновых популяций клеток китайского хомячка при длительном культивировании. Цитология, 1981, 23, 7: 818–830.
15. **Гринчук Т.М., Игнатова Т.Н., Ефимова Е.В., Сорокина Е.А.** Кариотипические особенности клеток китайского хомячка линии CHO-K1, устойчивых к колхицину. Цитология. 1986, 28, 1: 63–68.
16. **Derouazi M., Martinet D., Besuchet N., Schmutz N., Flaction R., Wicht M., Bertschinger M., Hacker D.L., Beckmann J.S., Wurm F.M.** Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 340, 4: 1069–1077.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ, АПОПТОЗ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

С.С. Смирнова, Д.М. Даниленко, Т.Д. Смирнова, Н.В. Дунаева, К.В. Сивак

ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, cellcultures@influenza.spb.ru

При экспериментальном тестировании противовирусных препаратов широко используются культивируемые клетки. В настоящей работе проведено сравнительное изучение влияния противовирусных препаратов – ингавирина, триазавирина, рибавирина и ремантадина на

пролиферацию, апоптоз и дифференцировку интактных культивируемых клеток человека. Эксперименты выполнены на нормальных и опухолевых клетках нескольких линий: ФЛЭЧ (диплоидные фибробласты легкого эмбриона человека), ECV-304 (спонтанно трансформированные клетки эндотелия), A-549 (эпителиоидные клетки карциномы легкого) и K-562 (клетки миелогенной лейкемии человека). На линии K-562 впервые исследовано влияние противовирусных препаратов на дифференцировку гемопозитических клеток эритроидного ряда. Наличие гемоглобина в клетках этого ряда служило маркером их дифференцировки.

Показано, что характер и степень влияния противовирусных препаратов на функции исследуемых клеток *in vitro* зависели от концентрации препаратов и продолжительности их воздействия на клетки. Реакции клеток на добавление противовирусных препаратов в культуральную среду на протяжении трех пассажей были различны; наименьшие изменения показателей пролиферации и апоптоза были выявлены у диплоидных фибробластов линии ФЛЭЧ.

Сравнительный анализ полученных данных показал, что ремантадин и рибавирин в высоких и средних концентрациях подавляли пролиферацию всех исследуемых клеток, в то время как ингавирин и триазавирин в большинстве опытов ее стимулировали. При этом ростстимулирующая активность ингавирина была значительно выше, чем триазавирина. Апоптоз в клетках изученных линий в разной степени индуцировали все препараты, кроме ремантадина, который практически не влиял на этот показатель в опытах с клетками суспензионной линии K-562. Дифференцировку клеток эритроидного ряда линии K-562 стимулировали рибавирин (в наибольшей степени), а также ингавирин и триазавирин. При добавлении ремантадина не было выявлено статистически значимых отличий показателей дифференцировки клеток от контроля.

В результате проведенного исследования получены дополнительные данные, позволяющие оценить воздействие известных противовирусных препаратов на пролиферацию, апоптоз и дифференцировку как нормальных, так и опухолевых клеток, что может способствовать более обоснованному назначению данных препаратов в терапии и профилактике различных вирусных инфекций.

Ключевые слова: клеточные культуры ФЛЭЧ, ECV-304, A-549, K-562, противовирусные препараты, пролиферация, апоптоз, дифференцировка.

Клеточные культуры человеческого происхождения в последние годы широко используются не только для выделения вирусов и изучения их репродукции на молекулярном уровне, но и для поиска эффективных средств защиты от вирусных инфекций. При отборе противовирусных препаратов на клеточных культурах проводится оценка их токсичности и противовирусной активности. Основное тестирование противовирусных препаратов проводится по их способности подавлять цитопатическое действие вируса (ЦПД) в перmissive клеточных линиях, однако существует ряд препаратов, не проявляющих противовирусной активности *in vitro*, но оказывающих защитный эффект в условиях *in vivo*. Ранее нами было изучено изменение пролиферации и апоптоза в ряде монослойных и суспензионных клеточных линий при инфицировании разными дозами вирусов гриппа А. Было показано, что противовирусные препараты способны влиять на эти измененные вирусом характеристики клеток [1, 2]. В большинстве опытов исследуемые противовирусные препараты использовались в ограниченных (не токсичных) концентрациях и учет результатов обычно проводился на ранних сроках (1–3 сут). В этих условиях влияние самих препаратов на клеточные функции, как правило, было минимальным. Было показано также, что ряд противовирусных препаратов при добавлении к интактным, не инфицированным вирусом культивируемым клеткам, проявляет собственную активность в отношении индукции или ингибирования пролиферации и апоптоза клеток.

При тестировании противовирусных препаратов интересным представляется изучение их влияния на дифференцировку клеток. Сюе с соавт. [3] описали один из методов исследования дифференцировки клеток *in vitro*, который был основан на способности эритробластов линии К-562 к дифференцировке в гемоглобин-синтезирующие клетки под воздействием некоторых индукторов эритропоэза (гемина и масляной кислоты).

Цель нашего исследования состояла в изучении воздействия некоторых известных противовирусных препаратов на пролиферацию, апоптоз и дифференцировку культивируемых нормальных и опухолевых клеток человека. При этом препараты использовали в расширенном диапазоне концентраций и добавляли в среду культивирования клеток на протяжении длительного времени: до 12 сут при однократном внесении или на протяжении трех пассажей при добавлении препаратов во время каждого пересева.

Материал и методы

Клеточные линии. В работе использовали 3 монослойные клеточные линии человека из Коллекции клеточных культур ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ: ФЛЭЧ (диплоидные фибробласты легкого эмбриона человека), ECV-304 (спонтанно трансформированные клетки эндотелия),

А-549 (клетки карциномы легкого человека). Клетки культивировали с использованием питательной среды альфа-МЕМ с добавлением 5% фетальной сыворотки (ФС) для линии ФЛЭЧ и 2% ФС – для линий ECV-304 и А-549. Пересев клеток проводили на 6–7 сут, используя для снятия монослоя клеток раствор версен/химопсин.

Эксперименты выполняли, также, на суспензионной линии клеток К-562 миелогенной лейкемии человека, полученной из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки этой линии культивировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 5% ФС, пересев клеток проводили на 5–6 сутки. Все клеточные линии культивировали без антибиотиков. Производитель питательных сред и ФС – фирма «БИОЛОТ».

Исследуемые препараты. Триазавирин (отечественный препарат, разработанный в Институте органического синтеза Уро РАН, находящийся на 3-й стадии клинических испытаний) и ингавирин («Валента Фармацевтика», Россия) использовали в концентрациях 31.2, 62.5, 125, 250 и 500 мкг/мл; ремантадин (Sigma, Германия) – в концентрациях 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25 мкг/мл; рибавирин-1 (ICN, США) – в концентрациях 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 и 100 мкг/мл и его аналоги: рибавирин-2 («Озон», Россия) и копегус (Roche, Швейцария) – в концентрациях 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50, 62.5, 125 мкг/мл. Эпокрин (рекомбинантный эритропоэтин человека, производства НИИ особо чистых биопрепаратов) использовали в концентрациях 31.2, 62.5, 125 и 250 МЕ/мл. Навески препаратов растворяли в бессывороточной питательной среде альфа-МЕМ (для опытов на монослойных культурах) или RPMI-1640 (для опытов на суспензионной культуре клеток К-562). Приготовленные растворы пропускали через фильтры с диаметром пор 0,25 мкм. Контролем служили интактные клетки, культивируемые параллельно с опытными образцами.

Проведение опытов на монослойных клеточных культурах.

Исследование выполняли на 24-луночных планшетах на протяжении 3-х пассажей. Для посева использовали 4-суточную культуру с концентрацией 5×10^4 кл/мл. В лунки планшета вносили по 1 мл препарата двукратной концентрации и по 1 мл клеток. Все последующие пассажи клеток проводили на 4–5 сутки. Для снятия клеток в лунки вносили по 0,1 мл раствора версен/химопсин. Затем клеточную суспензию пипетировали в 1 мл среды альфа-МЕМ с 2–5 % ФС. Из каждой лунки отбирали по 0,1 мл для подсчета клеток; 0,5 мл клеточной суспензии переносили в другой планшет с покровными стеклами (для изучения апоптоза). В контрольные лунки добавляли по 0,5 мл среды без сыворотки, а в опытные – по 0,5 мл среды с противовирусными препаратами в соответствующих разведениях.

Проведение опытов на клетках суспензионной культуры K-562.

Изучение пролиферации, апоптоза и дифференцировки клеток K-562 на протяжении 3-х пассажей проводили по методике, описанной выше, за некоторыми исключениями: посевная концентрация клеток составляла 1×10^5 кл/мл, для получения клеточной суспензии во время посева использовали мягкое пипетирование. Из 2 мл полученной суспензии клеток 0,2 мл отбирали для подсчета клеток, 0,65 мл переносили в другой планшет с покровными стеклами и 0,5 мл отбирали в эппендорфы для проведения окрашивания на гемоглобин с целью оценки дифференцировки клеток. Затем вносили в контрольные лунки планшетов по 0,65 мл среды RPMI-1640 без сыворотки, в остальные лунки – по 0,65 мл среды с препаратами в соответствующих двукратных разведениях. Далее во все лунки вносили по 0,65 мл среды RPMI-1640 с 5 % ФС.

Для проведения опытов в течение 12 дней использовали для посева 1-суточную культуру с концентрацией клеток $2,5 \times 10^5$ кл/мл с одновременным посевом на планшеты для каждого срока учета опыта (3, 7 и 12 сут). В этой серии опытов из лунок отбирали клетки для подсчета и для оценки дифференцировки.

Пролиферацию клеток определяли с помощью подсчета в камере Фукса-Розенталя. Долю выросших клеток выражали в процентах от контроля, который принимали за 100 % [4].

Индекс апоптоза (ИА) оценивали по степени деградации хроматина в клетках, выросших на покровных стеклах и окрашенных флуоресцентным красителем Hoechst-33258, как описано ранее [4]. В каждом препарате просматривали от 100 до 500 клеток в 10 полях зрения под люминесцентным микроскопом. Индекс апоптоза высчитывали по формуле: $ИА = (b/c) \times 100\%$, где b – количество апоптозных клеток, c – общее количество просмотренных клеток. Конечный результат выражали в виде разности: $ИА' = ИА$ в опыте – $ИА$ в контроле.

Определение индекса дифференцировки (ИД). Наличие гемоглобина в клетках эритроидного ряда линии K-562 является маркером их дифференцировки. Гемоглобин в клетках выявляли с помощью окрашивания раствором бензидина по методике, описанной в статье de Сароа с соавторами [5]. Суспензию клеток K-562 из контрольных и опытных лунок дважды отмывали PBS, окрашивали 10 мин при $+37\text{ }^\circ\text{C}$ 0,2%-ным раствором бензидина (20 мг бензидина фирмы Sigma–Aldrich растворяли в 50 мкл ДМСО и 10 мл $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$ с 0,3 % H_2O_2 в 5 М уксусной кислоте), центрифугировали при 1500 об/мин 10 мин, отмывали в PBS, ресуспендировали осадок в 0,5 мл PBS и раскапывали на предметные стекла. Препараты анализировали под световым микроскопом с иммерсией при увеличении $\times 900$. В каждом

препарате в 10 полях зрения просматривали от 100 до 500 клеток. Результат определяли в виде индекса дифференцировки (ИД) по формуле: $ИД = (b/c) \times 100 \%$, где b – количество целиком окрашенных (синтезирующих гемоглобин) клеток, c – количество просмотренных клеток. Конечный результат выражали в виде разности: $ИД' = ИД \text{ в опыте} - ИД \text{ в контроле}$.

Для каждого контроля и опыта использовали по две лунки, эксперименты проводили в двух повторностях.

Статистический анализ выполнен с использованием теста U–Манна-Уитни для сравнения двух групп непараметрических выборок. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Влияние препаратов на пролиферацию клеток в исследуемых клеточных линиях при культивировании на протяжении нескольких пассажей.

В результате проведения серии экспериментов было показано, что ингавирин, в основном в высоких и средних концентрациях (500 и 125 мкг/мл), достоверно стимулировал пролиферацию клеток во всех используемых клеточных линиях (рис. 1). Максимальная пролиферация клеток ФЛЭЧ достигала 148,4% (относительно контроля), клеток ECV-304 – 164% на 3-м пассаже при воздействии ингавирина в концентрации 125 мкг/мл. Пролиферация клеток А-549 достигала максимума – 169,2% при воздействии ингавирина в концентрации 125 мкг/мл на 2-м пассаже, а клеток К-562 – 159,7 % при концентрации ингавирина 500 мкг/мл на 2-м пассаже.

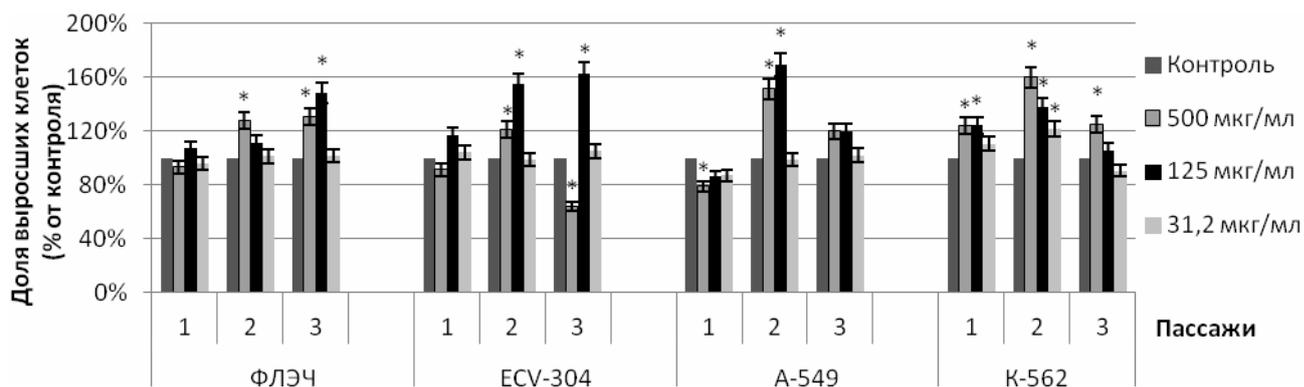


Рис. 1. Влияние ингавирина на пролиферацию клеток ФЛЭЧ, ECV-304, А-549 и К-562 на протяжении 3-х пассажей (* - отличие от контроля при $p < 0,05$)

Триазавирин не влиял на пролиферацию клеток ФЛЭЧ, но вызывал достоверное повышение пролиферации клеток ECV-304 при средней концентрации 125 мкг/мл на 2-м и 3-м пассажах (до 167,4 % и 150,6 %, соответственно) и при высокой концентрации 500 мкг/мл – на 3-м пассаже (до 137,0 %). Достоверная стимуляция пролиферации клеток А-549 отмечена при

воздействии триазавирина в концентрации 500 мкг/мл на 2-м и 3-м пассажах (до 142,3% и 139,6%, соответственно) и на 2-м пассаже (до 125,6%) при концентрации 31,2 мкг/мл (рис. 2). В то же время триазавирин подавлял пролиферацию клеток К-562 в высокой концентрации (500 мкг/мл) на 1-м и 2-м пассажах, а на 3-м пассаже пролиферацию достоверно ингибировали уже более низкие концентрации триазавирина (31,2 и 125 мкг/мл).

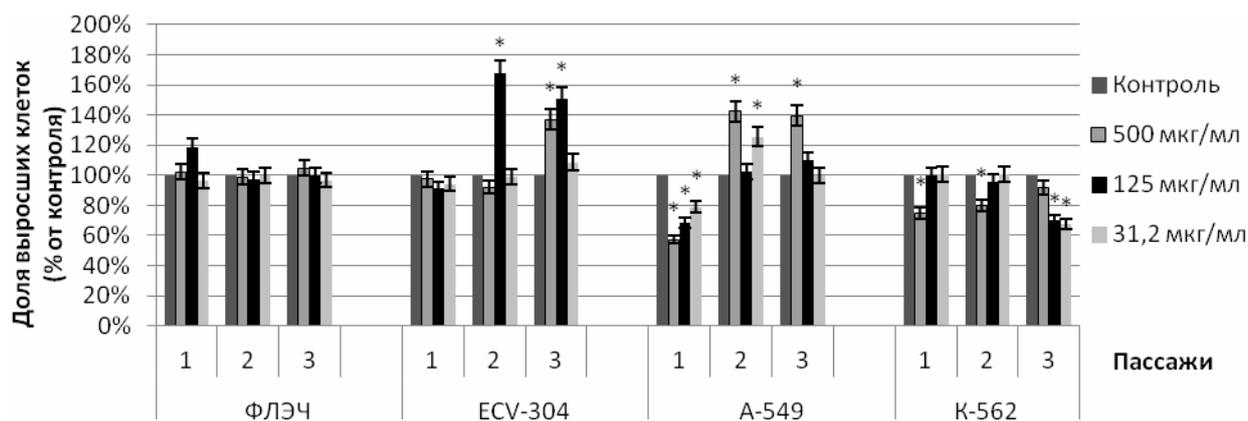


Рис. 2. Влияние триазавирина на пролиферацию клеток ФЛЭЧ, ECV-304, А-549 и К-562 на протяжении 3-х пассажей (* - отличие от контроля при $p < 0,05$)

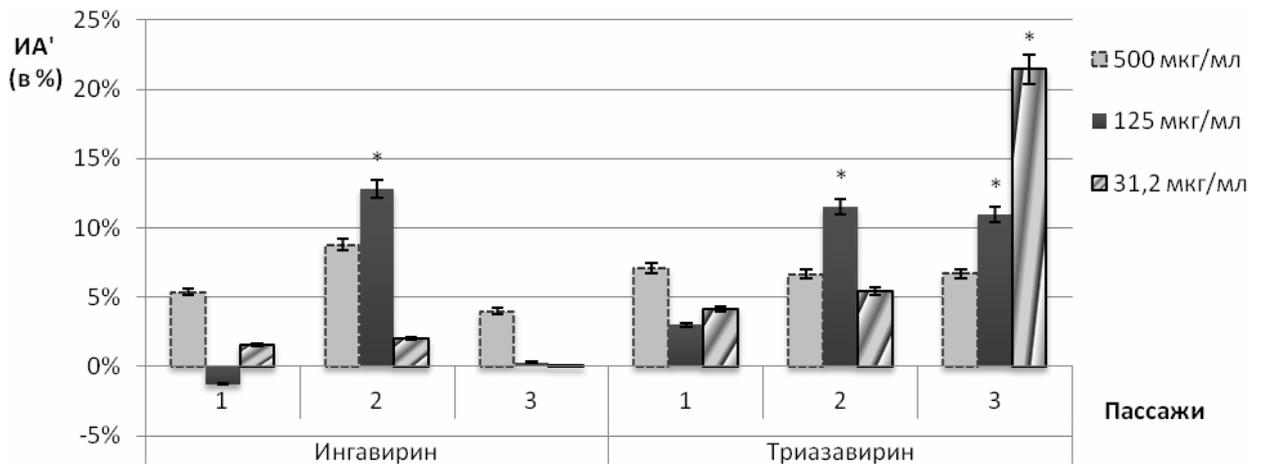
Препараты ремантадин, рибавирин-1 и его аналоги дозозависимо подавляли пролиферацию всех клеточных линий. При воздействии ремантадина в концентрации 25 мкг/мл и рибавирина-1 в концентрациях 50 и 100 мкг/мл все клетки погибали к 3-му пассажу. Ремантадин в концентрации 12,5 мкг/мл ингибировал пролиферацию до 30–70% от уровня контроля, в концентрации 6,2 мкг/мл – до 55–80%. Концентрация 3,1 мкг/мл была практически не токсична для клеток на протяжении 3-х пассажей. Рибавирин в концентрации 25 мкг/мл подавлял пролиферацию клеток ФЛЭЧ и ECV-304 до 40–60%, а опухолевых клеток А-549 и К-562 – до 8–19%; при концентрации 12,5 мкг/мл пролиферация клеток ФЛЭЧ и ECV-304 ингибировалась до 60–80% и до 11,5% в клетках К-562. Более низкие концентрации рибавирина (6,2 и 3,1 мкг/мл) достоверно подавляли пролиферацию только клеток К-562.

Влияние препаратов на апоптоз клеток в исследуемых клеточных линиях при культивировании на протяжении нескольких пассажей.

В результате исследования выявлено, что все тестируемые противовирусные препараты в разной степени индуцировали апоптоз культивируемых клеток человека. Наименее чувствительны к индукции апоптоза были диплоидные фибробласты ФЛЭЧ. В клетках А-549

триазамирин был способен индуцировать апоптоз (до 25 %) на 3-м пассаже при добавлении препарата в концентрациях 62,5 и 250 мкг/мл. В клетках ECV-304 на 2-м и 3-м пассаже все препараты вызывали апоптоз (не выше 10%). В клетках K-562 все препараты, за исключением ремантадина, вызывали апоптоз на 2-м и 3-м пассажах при добавлении практически всех используемых концентраций (рис. 3). Максимальный ИА в клетках K-562 при воздействии ингавирина был на уровне 12% на 2-м пассаже при концентрации препарата 125 мкг/мл, триазамирин – около 22% при концентрации препарата 31,2 мкг/мл, но самый высокий ИА был обнаружен при воздействии рибавиринов (ИА' до 30–49,5 %) в концентрациях 50, 25 и 12,5 мкг/мл (рис. 3.Б)

А



Б

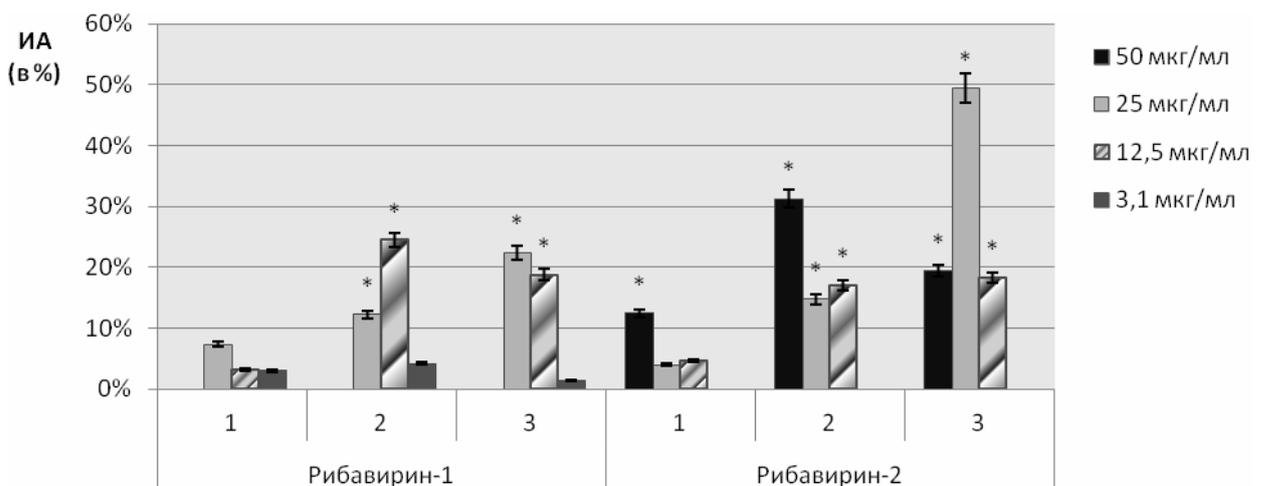


Рис. 3. Влияние ингавирина и триазамирин (А) и рибавиринов (Б) на апоптоз в клетках K-562 на протяжении 3-х пассажей (* - отличие от контроля при $p < 0,05$)

Влияние препаратов на дифференцировку клеток К-562.

В начале этой серии экспериментов было проведено изучение способности клеток эритроидного ряда линии К-562 к синтезу гемоглобина под воздействием стимулятора эритропоэза, в качестве которого был выбран аптечный препарат «Эпокрин». В некоторых контрольных клетках на третьи сутки культивирования было выявлено небольшое количество бензидин-положительных (содержащих гемоглобин) мелких гранул, количество которых постепенно увеличивалось к 12-м сут, что свидетельствовало о спонтанной дифференцировке клеток эритроидного ряда. При индукции эритропоэза эпокрином появлялись клетки, целиком окрашенные раствором бензидина. Максимальная индукция синтеза гемоглобина в клетках под воздействием эпокрин в концентрации 62,5 МЕ/мл (ИД' до 46,25%) была отмечена на 7-е сутки при однократном внесении препарата в культуральную среду. Эти результаты явились подтверждением возможности использования клеток линии К-562 в наших экспериментах по изучению влияния противовирусных препаратов на дифференцировочный потенциал клеток.

При изучении дифференцировки клеток К-562 были использованы две схемы применения противовирусных препаратов: 1) однократное внесение препарата на длительный срок (до 12 суток) и 2) добавление препарата при каждом пересеве клеток на протяжении 3-х пассажей.

При однократном внесении препаратов на длительный срок без смены среды максимальное количество целиком окрашенных на гемоглобин клеток обнаруживалось на 7–12 сутки. Количество дифференцированных клеток в присутствии ремантадина в концентрациях 6,2 и 25 мкг/мл было, в основном, ниже, чем в контроле, а при концентрации 3,1 мкг/мл – на уровне контроля (рис.4). Ингавирин (500, 125 и 62,5 мкг/мл), добавленный в культуральную среду на 3 сутки, вызывал подавление синтеза гемоглобина в клетках К-562. Синтез гемоглобина обнаруживался на 7-е сутки при добавлении ингавирина в концентрациях 125 и 62,5 мкг/мл (ИД', 22,8 и 18,8% соответственно), а максимальная индукция синтеза гемоглобина под воздействием ингавирина (ИД' 36,2 и 27,2 %) была отмечена на поздних сроках (12 сутки) при концентрациях 500 и 125 мкг/мл, соответственно (рис. 4).

Триазавирин в высоких и средних концентрациях (500, 125 мкг/мл) вызывал подавление синтеза гемоглобина на 3-и, 7-е и 12-е сутки. В то же время, низкие концентрации триазавирина (62,5 мкг/мл) вызывали стимуляцию синтеза гемоглобина до 13,8 и 16,3 % на 7-е и 12 –е сутки, соответственно (рис. 4).

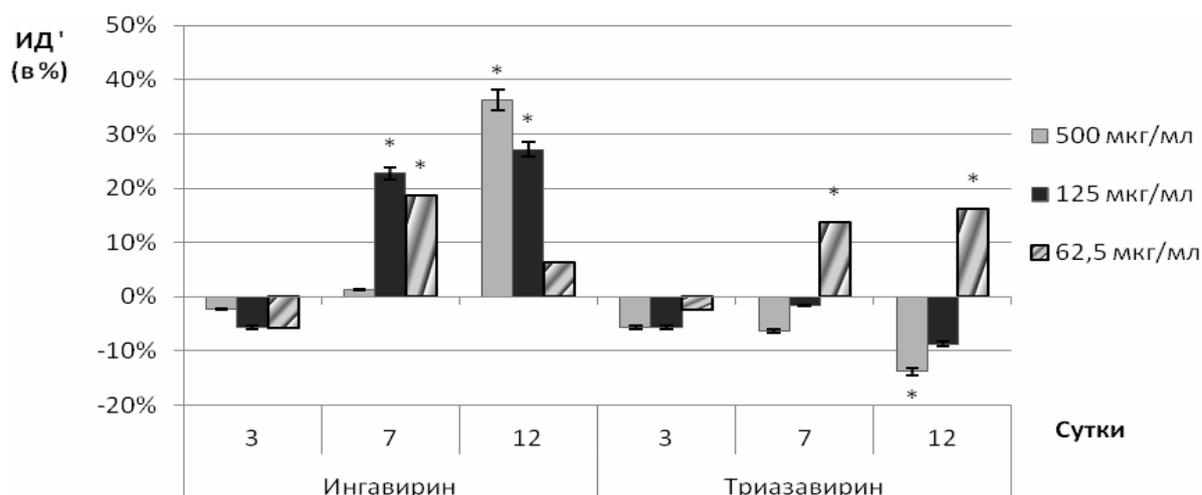


Рис. 4. Влияние ингавирина и триазавирина на дифференцировку клеток К-562 в течение 12 суток (* - отличие от контроля при $p < 0,05$)

Сравнительное изучение трех препаратов рибавирина показало (рис. 5), что все они в разной степени были способны стимулировать синтез гемоглобина. На 7-е сутки только рибавирин-1 обнаружил способность к индукции синтеза гемоглобина при концентрации 25 мкг/мл (ИД' 41,2%). Активный синтез гемоглобина в присутствии всех трех препаратов наблюдался только на 12 сут, причем наибольшая стимулирующая активность отмечена у рибавирина-1 в концентрации 25 мкг/мл (ИД' 26,3%), ниже – у рибавирина-2 при всех концентрациях и копегуса при концентрациях 25 и 50 мкг/мл (ИД' 16,6 и 18,0%, соответственно).

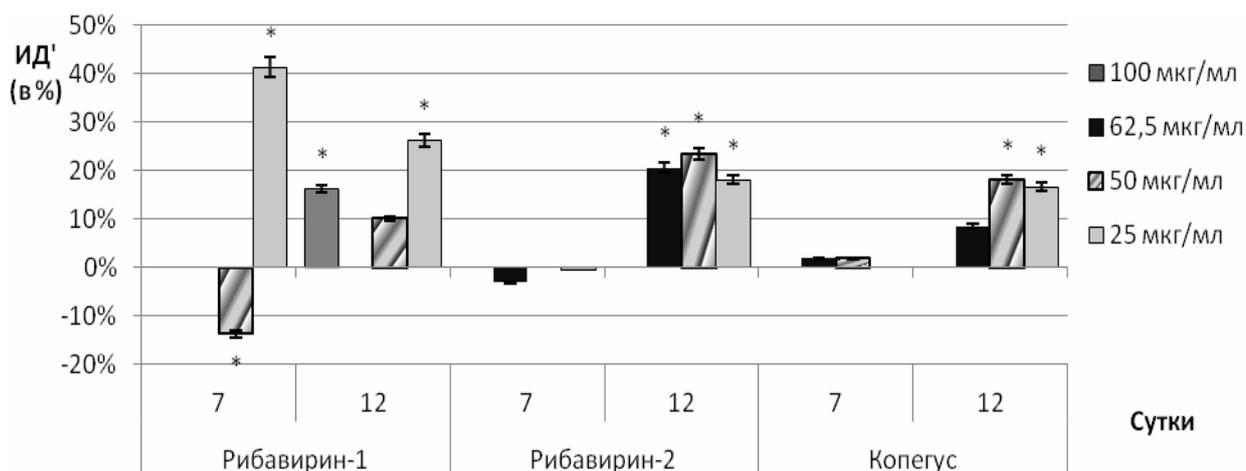


Рис. 5. Влияние рибавиринов на дифференцировку клеток К-562 в течение 12 суток (* - отличие от контроля при $p < 0,05$)

При использовании второй схемы добавления препаратов (на 3-х пассажах при пересеве клеток) не было выявлено достоверной стимуляции синтеза гемоглобина под воздействием триазавирина и ингавирина. Появление гемоглобин-синтезирующих клеток в присутствии рибавиринов 1 и 2 обнаруживалось уже на 1-м пассаже (рис. 6). Рибавирины активно стимулировали дифференцировку, так как по своей структуре они являются аналогами нуклеотида гуанозина, который, как показано в работе Волковой с соавт. [6], обладает дифференцирующим действием на клетки K-562.

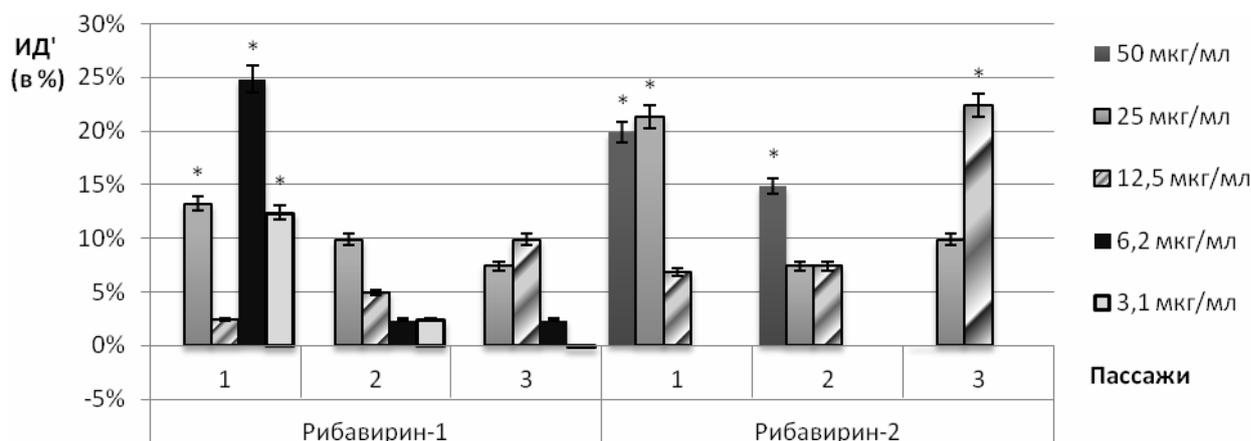


Рис. 6. Влияние рибавирина-1 и рибавирина-2 на дифференцировку клеток K-562 на протяжении 3-х пассажей (* - отличие от контроля при $p < 0,05$)

Таким образом, в своей работе мы провели сравнительное изучение способности некоторых противовирусных препаратов влиять на основные характеристики интактных клеток *in vitro*: пролиферацию, апоптоз и дифференцировку. Для этого нами было использовано несколько клеточных линий различного происхождения. В наших опытах мы также расширили диапазон используемых концентраций препаратов и увеличили продолжительность их применения. Были выявлены следующие закономерности: нормальные диплоидные фибробласты проявили минимальную чувствительность к исследуемым препаратам в тестах по выявлению их влияния на пролиферацию и апоптоз. Изменение состояния исследуемых клеток усиливалось с увеличением продолжительности применения препаратов. В этих случаях низкие концентрации препарата могли вызвать эффект, сравнимый с эффектом от воздействия высоких концентраций на ранних сроках.

На основании данных, полученных в настоящей работе, а также результатов, опубликованных ранее [1, 2, 4], можно следующим образом охарактеризовать воздействие

исследуемых препаратов на функциональные характеристики интактных и инфицированных вирусами клеток:

1. В настоящей работе показано, что **ингавирин** (имидазоллэтанами́д пентандиовой кислоты) [7] вызывает усиление пролиферации как трансформированных, так и нормальных клеток, незначительно индуцирует апоптоз и стимулирует дифференцировку клеток K-562 после продолжительного применения. Ранее нами было обнаружено, что ингавирин не индуцирует экспрессию фактора некроза опухоли (ФНО) в клетках ECV-304 и A-549, а в присутствии вируса гриппа А ингавирин не подавляет ЦПД вируса, но усиливает вирус-стимулированную пролиферацию клеток и ингибирует вирус-индуцированный апоптоз, также как и индуцированную вирусом экспрессию ФНО [2].

2. **Триазавирин** (2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-С]-1,2,4-триазин-7(4Н)-ОН-дегидрат натриевой соли) [7, 8] незначительно стимулирует пролиферацию интактных клеток эндотелия, но ингибирует пролиферацию опухолевых клеток K-562; индуцирует апоптоз в клетках (кроме ФЛЭЧ), и незначительно стимулирует дифференцировку клеток K-562 при низких концентрациях. Ранее нами было показано, что триазавирин способен к индукции экспрессии ФНО, а при инфицировании клеток вирусом гриппа А не подавляет ЦПД вируса, но ингибирует транслокацию вирусного нуклеопротеина из ядра в цитоплазму, ингибирует вирус-стимулированную пролиферацию клеток, усиливает вирус-индуцированный апоптоз клеток и незначительно снижает вирус-индуцированную экспрессию ФНО [1, 2, 4].

3. **Ремантадин** (альфа-метил-1-адамантанметиламин – производное адамантана) [7] вызывает дозозависимое подавление пролиферации клеток, слабую индукцию апоптоза в клетках эндотелия и не обладает способностью к стимуляции дифференцировки клеток K-562. Ранее нами было показано, что ремантадин при заражении клеток вирусом гриппа А подавляет ЦПД ремантадин-чувствительных штаммов вируса, но ингибирует транслокацию вирусного нуклеопротеина из ядра в цитоплазму как у чувствительных, так и у ремантадин-устойчивых штаммов вирусов; ингибирует вирус-стимулированную пролиферацию клеток и вирус-индуцированный апоптоз; не индуцирует экспрессию ФНО и ингибирует вирус-индуцированную экспрессию ФНО [1, 2, 4].

4. **Рибавирин** (упрощенный аналог гуанозина, лишенный пиримидинового кольца [7, 9] обладает дозозависимой токсичностью для всех клеток. Низкие концентрации препарата индуцируют слабый апоптоз в клетках эндотелия, но в клетках K-562 рибавирин вызывает высокий уровень апоптоза, особенно при длительном применении. Препарат активно

стимулирует дифференцировку клеток K-562 как при однократном добавлении на 7-12 суток, так и уже на первом пассаже. Из трех исследованных препаратов различных фирм-изготовителей наибольшей активностью обладал рибавирин-1 – очищенное действующее вещество без вспомогательных добавок. Ранее нами было показано, что рибавирин подавляет ЦПД вируса, подавляет транслокацию вирусного нуклеопротеина из ядра в цитоплазму, ингибирует вирус-стимулированную пролиферацию клеток, усиливает вирус-индуцированный апоптоз клеток; не обладает способностью вызывать экспрессию ФНО и подавляет индуцированную вирусом экспрессию ФНО [1, 2, 4].

В результате проведенного исследования получены дополнительные характеристики известных противовирусных препаратов, которые позволяют по-новому оценить их биологическое воздействие на клетки, и могут способствовать более обоснованному назначению данных препаратов в терапии и профилактике различных вирусных инфекций.

Список литературы

1. **Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Еропкин М.Ю., Деева Э.Г., Киселев О.И.** Изучение влияния ремантадина, рибавирина и триазавирина на репродукцию вирусов гриппа А в монослойных и лимфобластоидных клеточных линиях человеческого происхождения. Антибиотики и химиотерапия. 2011, 56: 11–16.
2. **Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Плотникова М.А., Кадырова Р.А., Слита А.В., Еропкин М.Ю.** Изучение влияния разных субтипов вируса гриппа А в присутствии противовирусных препаратов на пролиферацию и индукцию фактора некроза опухоли в клеточных линиях человека А-549 и ECV-304. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2012, 28: 37–49.
3. **Cioe L., McNab A., Hubbell HR, Meo P., Curtis P., Rovera G.** Differential expression of the globin genes in human leukemia K562(S) cells induced to differentiate by hemin or butyric acid. Cancer Res. 1981, 41: 237–243.
4. **Смирнова Т.Д., Гудкова Т.М., Кузнецова И.К., Рыжак Г.А.** Разработка модели взаимоотношения вируса гриппа А с перевиваемыми лимфобластоидными клетками человека для изучения биологических особенностей вируса и определения активности противовирусных препаратов. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2009, 24: 25–34.
5. **de Capoa A., Baldini A., Marlekaj P., Gambari R., Raschellà G., Fantoni A.** Cytologic evidence for increased rRNA gene activity in hemin-induced K562(S) cells. Cancer Genet. Cytogenet. 1985, 17 (2): 113–122.
6. **Волкова Т.О., Малышева И.Е., Немова Н.Н.** Сравнительный анализ дифференцирующего и апоптогенного действий цитидина, тимидина и гуанозина на клетки эритромиелозной линии человека K562. Вопросы мед. химии. 2002, 6: 586–593.
7. **Киселев О.И.** Химиопрепараты и химиотерапия гриппа. – СПб.: Росток. 2012, 272.
8. **Karpenko I., Deev S., Kiselev O., Charushin V, Rusinov V, Ulomsky E, Deeva E, Yanvarev D, Ivanov A, Smirnova O, Kochetkov S, Chupakhin O, Kukhanova M.** Antiviral properties, metabolism, and pharmacokinetics of a novel azolo-1,2,4-triazine-derived inhibitor of influenza A and B virus replication. Antimicrob. Agents Chemother. 2010, 54: 2017–2022.

9. Галегов Г.А., Львов Н.Д., Петрова И.Р., Флорентьев В.Л. Рибавирин как противовирусный химиопрепарат: химия, молекулярный механизм действия, возможности клинического применения. *Вопр. Мед. Хим.* 1986, 32 (1): 10–19.

ИЗМЕНЕНИЕ РОСТОВОЙ АКТИВНОСТИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПОЛИОКСОМЕТАЛЛАТОВ

*И.А. Суетина¹, М.В. Мезенцева¹, Е.А. Гущина¹, Ф.А. Лисицин¹, Л.И. Руссу¹,
О.А. Лопатина¹, Е.Л. Фирсова¹, С.А. Ковалевский², Б.А. Буданов², Ф.И. Далидчик²,
А.С. Селезнев³, Р.А. Морозов³*

¹ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва cells@rambler.ru; ² ФГБУ Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва; ³ Зеленоградский нанотехнологический центр, Москва.

С целью изучения влияния наноматериалов на морфофункциональные характеристики клеток проведено сравнительное тестирование препаратов наночастиц – полиоксометаллатов (ПОМ) в культуре фибробластов эмбриона человека линии ФЭЧ-Т. Эксперименты выполнены с полиоксиметаллатами $H_3PW_{12}O_{40}$, $H_4SiW_{12}O_{40}$, $H_4SiMo_{12}O_{40}$ и $H_3PMo_{12}O_{40}$, которые в разных концентрациях добавляли в среду культивирования клеток. Показано различное токсическое воздействие исследуемых препаратов на клетки. С помощью МТТ-теста выявлено снижение пролиферации клеток в процессе их инкубации с изучаемыми препаратами в концентрации 625–5000 мкМ/мл. Наибольшая цитотоксичность через 24 часа инкубации выявлена у препарата $H_3PW_{12}O_{40}$, содержащего атомы вольфрама, наименьшая – у препарата $H_4SiMo_{12}O_{40}$, содержащего атомы молибдена, что может свидетельствовать о зависимости степени воздействия тестируемых ПОМ на клетки от физико-химических свойств препаратов.

На электронных микрофотографиях, полученных с помощью трансмиссионной и растровой электронной микроскопии, обнаружены патологические изменения морфологии клеток при их инкубации в течение 48 часов с исследуемыми ПОМ – разрушение мембранных структур цитоплазмы клеток, деструкция ядер, увеличение количества и размеров вакуолей в цитоплазме, появление множества аутофагосом и др.

Изучено потенциальное влияние тестируемых препаратов наночастиц на параметры иммунитета. Все препараты в разведениях 1\100–1\500 способствовали активации в