

И.С.Хрипков

Днепропетровская
государственная медицинская
академия

Ключевые слова: митотическая активность, экзогенная РНК, опухоль Герена.

Надійшла: 18.05.2008

Прийнята: 20.06.2008

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ОПУХОЛИ ГЕРЕНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ГОМОЛОГИЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Резюме. Способность экзогенных РНК проникать внутрь клеток и вызывать в них фенотипические превращения, изменяя характер метаболических процессов, послужило поводом для применения РНК с целью направленного воздействия на обмен опухолевых клеток. Целью нашего исследования явилось изучение влияния гомологичных опухолевых РНК на пролиферативную активность клеток карциномы Герена. В качестве модели нами был использован перевивной опухолевый штамм карциномы Герена. РНК выделяли методом термического фенольного фракционирования. Индекс меченых ядер при введении гомологичной опухолевой РНК достоверно снижался на 40%, что сопровождалось снижением индекса компоновки ткани на 15%. Таким образом, на основании анализа экспериментального материала можно сделать вывод, что экзогенная гомологичная опухолевая РНК вызывает достоверное уменьшение количества ДНК-синтезирующих клеток, что сопровождается увеличением степени атипии клеток карциномы Герена.

Морфологія.- 2008.- Т.ІІ, №3.- С.77-80.

© И.С.Хрипков, 2008

Khripkov I.S. Proliferative activity of Guerin's tumour cells under the action of homologous tumour ribonucleic acids.

Summary. Ability of exogenous ribonucleic acids (RNAs) to penetrate into cells and to cause the phenotypic transformations, changing the character of metabolic process, was the reason for application of RNAs with the purpose of determined action on metabolism of tumour cells. The aim of our research was to study the influence of homologous tumour RNAs on proliferative activity of Guerin's carcinoma cell. We used the transplantable tumor culture of Guerin's carcinoma. RNAs was extracted by the method of thermal phenol fractioning. Radiolabeled nuclei index decreased for 40% after exogenous homologous tumour RNAs treatment. It was accompanied by the decrease of packing tissues index for 15%. Thus, on the basis of analysis of experimental material we can conclude that exogenous homologous tumour RNAs causes the decrease of DNA-producing cells number with the increase of atypism degree of Guerin's carcinoma cells.

Key words: proliferative activity, exogenous RNA, Guerin's carcinoma.

Введение

Открытие класса нуклеиновых кислот, изучение их роли в регуляции процессов, протекающих в клетке, привело к появлению новой научной проблемы – возможности применения экзогенных нуклеиновых кислот для регуляции внутриклеточных процессов при введении этих кислот в организм реципиента.

При введении в организм и попадая в ткани экзогенные РНК сохраняют свою биологическую активность, что было убедительно продемонстрировано на примере РНК-индукторов интерферона (Colby C., 1971). В опытах V.Holoubek (1966) было показано, что экзогенные РНК очень быстро понижают в клетке, причем около 4% введенного количества локализуется в ядре. Включенная внутрь клетки РНК полностью сохраняет свой нуклеотидный состав и хроматографические свойства. Таким образом, возможность прохождения молекул экзогенных РНК

через цитолемму внутрь клетки в неизменном виде не вызывает сомнений, однако детальный механизм этого процесса не изучен (Bhargava P., Shamugam G., 1971).

Поступив внутрь клетки, экзогенные РНК могут, во-первых, функционировать в качестве информационных, транспортных или рибосомальных РНК, во-вторых, они могут выступать в роли регуляторных РНК, активируя синтез собственных РНК клетки, в-третьих, экзогенные РНК, разрушаясь нуклеазами, могут пополнять нуклеотидный пул клетки. Наконец, экзогенные РНК могут действовать одновременно несколькими из перечисленных способов. Экзогенные РНК из печени крысы при введении в матку мыши индуцируют синтез альбумина в клетках этого органа двумя путями: а) путем трансляции с образованием крысиного альбумина (этот путь не подавляется актиномицином, следовательно, осуществляется параклеточным); б) путем де-

репрессии генов, с образованием мышинового альбумина (синтез которого подавляется актиномицином) (Yang S.F., Niu M.C., 1977). Последний путь действия экзогенных РНК подтверждается их накоплением в ядрах клеток-реципиентов (Niu M.C., 1973).

Способность экзогенных РНК проникать внутрь клеток и вызывать в них фенотипические превращения, изменяя характер метаболических процессов, послужило поводом для применения РНК с целью направленного воздействия на обмен опухолевых клеток.

В работах ряда исследователей (Митиенко Н.А., 1971; Роничевская Г.М., 1972; Демина А.А., 1973) была показана способность экзогенных РНК, экстрагированных из тканей здоровых животных, угнетать рост опухолей. Экзогенная РНК, выделенная из печени крупного рогатого скота, тормозила рост асцитной карциномы Эрлиха, причем опухолевые клетки приобретали способность синтезировать новые белки, присущие только гепатоцитам. В последние годы появились работы о сильном противоопухолевом действии РНК-индукторов интерферона (Hubbel H.R., 1985; Chapekar M., 1986).

Интерес представляют и взаимоотношения между РНК, выделенными из опухолей и клетками нормальных органов и тканей, т.к. в опухолевых клетках и при канцерогенезе изменяется спектр вновь синтезированных РНК (Cantarow A., 1966). В работе А.И.Жудиной (1977) было показано, что препарат суммарной РНК, выделенной из сарком, обладают способностью трансформировать клетки в культуре ткани. Аналогичные результаты были получены De Carvalho (1977), который установил, что гепатоциты, обработанные опухолевой РНК, очень быстро малигнизировались и проявляли большую агрессивность в организме.

Во взаимоотношении опухоли и организма большую роль играет нуклеопротеидный комплекс, выделяемый опухолевыми клетками. Отмечена стимуляция роста опухоли после инкубации опухолевых клеток с нуклеиновыми кислотами, выделенными из асцитной жидкости. Нуклеопротеидный комплекс обладает также мощным иммунодепрессорным действием, создавая

благоприятные условия для роста опухоли в организме (Козак В.В., 1985). Однако мало изучен вопрос о влиянии гомологичных опухолевых РНК на морфофункциональное состояние опухолевых клеток-доноров.

Целью исследования явилось изучение влияния гомологичных опухолевых РНК на пролиферативную активность клеток карциномы Герена.

Материалы и методы

В качестве модели нами был использован перевивной опухолевый штамм карциномы Герена, полученный из НИИ онкологии им. Р.Е. Кавецкого. Опухоль поддерживалась путем последовательных перевивок взвеси клеток под кожу бедра белых крыс-самцов линии «Вистар». РНК выделяли методом термического фенольного фракционирования на 15 сутки роста опухоли. Для исследования брали фракцию, получаемую при температуре 65°C, что соответствует классу информационных РНК. Полученный препарат экзогенной опухолевой РНК, вводили животным с трансплантированной опухолью трехкратно с интервалом в сутки в дозе 200 мкг на 100 г массы тела, суммарная доза составила 600 мкг на 100 г массы тела. О пролиферативной активности клеток карциномы Герена судили на основании подсчета митотического индекса, индекса меченых ядер после введения H^3 -тимидина. На полутонких срезах определяли площадь ядер опухолевых клеток и индекс компоновки ткани. Оценку достоверности результатов проводили используя t -критерий Стьюдента, при этом достоверными считались изменения при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования представлены в таблицах 1 и 2. При анализе влияния экзогенной гомологичной опухолевой РНК обнаружено, что РНК не вызывает достоверных изменений митотического индекса клеток карциномы Герена. Однако, обращает на себя внимание тенденция к увеличению митотического индекса на 15% при введении гомологичной РНК, что может быть расценено как увеличение скорости перехода опухолевых клеток из G_2 -периода митотического цикла в митоз.

Таблица 1

Влияние гомологичной опухолевой экзогенной РНК на пролиферативную активность клеток карциномы Герена

Экспериментальная группа	Митотический индекс, %	Индекс меченый ядер, %
Контроль	10,68±1,04	209,05±39,93
Гомологичная опухолевая РНК	12,25±1,37	127,93±18,88*
РНК, обработанная рибонуклеазой	10,87±1,75	258,08±24,12

Примечание: * – $P < 0,05$.

Индекс меченых ядер при введении гомологичной опухолевой РНК достоверно снижался на 40%, что мы рассматриваем как результат уменьшения количества опухолевых клеток, находящихся в S-периоде митотического цикла. При анализе и сопоставлении этих двух результатов можно предположить, что введение экзогенной гомологичной опухолевой РНК вызывает ускорение прохождения опухолевыми клетками из G₂-периода митотического цикла в митоз, с последующим выходом клеток из митотического цикла в G₁-периоде цикла.

Для морфологической характеристики опу-

холи мы использовали такой показатель как «индекс компоновки» ткани, впервые предложенный Г.Г.Автандиловым (1984) и отражающий плотность упаковки клеток в изучаемом отделе опухоли. Согласно данным Г.Г.Автандилова (1984) по мере нарастания атипии клеток увеличивается относительный объем их ядер и снижается структурная упорядоченность ткани, демонстрируемая индексом компоновки ткани, который имеет тенденцию к снижению, например, с 9,0 (для исходной нормальной гладкомышечной ткани) до 2,3 (низкодифференцированная лейкомиосаркома).

Таблица 2

Влияние гомологичных экзогенных опухолевых РНК на структурные параметры опухоли Герена

Экспериментальная группа	Площадь ядер опухолевых клеток, мкм ²	Индекс компоновки ткани
Контроль	57,05±1,15	6,92
Гомологичная опухолевая РНК	57,13±1,04	5,89
РНК, обработанная рибонуклеазой	57,04±1,76	6,44

В условиях проведенного эксперимента, экзогенная гомологичная опухолевая РНК вызывает снижение индекса компоновки ткани при сравнении с контролем (интактная опухоль) на 15%, что может свидетельствовать о возрастании атипии клеток карциномы Герена после воздействия РНК.

Отсутствие эффекта у РНК, обработанной рибонуклеазой подтверждает специфичность действия экзогенных гомологичных опухолевых РНК.

Заключение

Таким образом, на основании анализа экспериментального материала можно сделать вы-

вод, что экзогенная гомологичная опухолевая РНК вызывает достоверное уменьшение количества ДНК-синтезирующих клеток, что сопровождается увеличением степени атипии клеток карциномы Герена.

Перспективы дальнейших исследований связаны с использованием модели экзогенных РНК для анализа межклеточных и внутриклеточных взаимоотношений между клетками с целью разработки способов локального направленного изменения метаболизма опухолевых клеток и контроля их взаимодействия с регуляторными системами организма.

Литературные источники

Автандилов Г. Г. Проблемы патогенеза и патологоанатомической диагностики болзней аспектах морфометрии / Г. Г. Автандилов. - М. : Медицина, 1984. - 284 с.

Влияние препаратов печеночной РНК и выделенных при их очистке примесей на развитие асцитной опухоли Эрлиха / Г. М. Роничевская, В. И. Рыкова, Р. П. Мартынова [и др.] // Вопр. онкол. - 1972. - Т. 18. - С. 59.

Демин А. А. Биологическое действие экзогенной РНК / А. А. Демин // Сов. мед. - 1973. - № 2. - С. 58.

Жудина А. И. О трансформирующем действии препаратов суммарной РНК, выделенной из сарком, индуцированных вирусом Рауса / А. И. Жудина, Г. Ф. Плужникова, К. Линдеберг // Вопр. онкол. - 1977. - № 7. - С. 26-34.

Козак В. В. Характеристика нуклеинового компонента нуклеопротеидного комплекса, выделяемого опухолевыми клетками / В. В. Козак, В. А. Шляховенко, М. Д. Юхименко // Экспер. онкол. - 1985. - № 4. - С. 36-39.

Митиенко Н. А. Тормозящие влияния гомологичной РНК на рост спонтанных опухолей у мышей высокоракковых линий А и С₃H / Н. А. Митиенко, Г. М. Роничевская, Д. К. Беляев // Пат. физиол. - 1971. - Т. 15. - С. 45.

Bhargava P. M. Uptake of nonviral nucleic acids by mammalian cells / P. M. Bhargava, G. Shanmugan // Progr. in nucl. acid. res. a. mol. biol. - 1971. - Vol. 11. - P. 104.

Cantarow A. Tumors in the rat after injection of neoplastic and preneoplastic nucleic acids / A. Cantarow, T. L. Williams, J. W. Goddard // Can-

ser res. – 1966. – Vol. 26, № 4. – P. 652-656.

Chapekar M. Potentiation of the citicidal effect human immune interferon by different synthetic double-stranded RNAs in the refractory human colon carcinoma cell line BE / M. Chapekar, R. I. Glazer // *Canser res.* – 1986. – Vol. 46, № 4. – P. 1698-1702.

Colby Cl. The induction of interferon by natural and synthetic polynucleotides / Cl. Colby // *Progr. in nucl. acid. res. a. mol. biol.* – 1971. – Vol. 11. – P. 1.

Holoubek V. The inhibition of nuclear RNA synthesis by added RNA / V. Holoubek, L. Fanshier, T. T. Crocker // *Exp. cell res.* – 1966. – Vol. 44. – P. 362-374.

Hubbel H. R. Antiproliferative and immunomodulatory action of β -interferon and double-stranded RNA, individually and in combination, on human bladder tumor xenografts in nude mice / H. R. Hubbel, K. Kvalues-Krick, W. A. Carter // *Canser res.* – 1985. – Vol. 45, № 6. – P. 2481-2486.

Niu M. C. In vivo uptake of RNA and it's function in castrate uterus / M. C. Niu, L. C. Niu, S. F. Yang // *Role RNA in reproduc. and develop.* – 1973. – P. 90-109.

Yang S. F. Aibumin synthesis in mouse uterus in response to liver mRNA / S. F. Yang, M. C. Niu // *Proc. nat. acad. sci. USA.* – 1977. – Vol. 74, № 5. – P. 1894-1898.

Хріпков І.С. Проліферативна активність клітин пухлини Герена при дії гомологічних пухлинних рибонуклеїнових кислот.

Резюме. Здатність екзогенних РНК проникати до клітин, змінюючи характер метаболічних процесів, є підставою для використання РНК з метою направленої дії на обмін пухлинних клітин. Метою дослідження є вивчення впливу гомологічних пухлинних РНК на проліферативну активність клітин карциноми Герена. В якості моделі нами був використаний пухлинний штамм карциноми Герена. РНК екстрагували методом термічного фенольного фракціонування. Індекс ядер ДНК-синтезуючих клітин при введенні гомологічної пухлинної РНК достовірно зменшувався на 40%, що супроводжувалось зниженням індекса компоновки тканини на 15%. Таким чином, на підставі аналізу експериментального матеріалу можливо зробити висновок, що екзогенна гомологічна пухлинна РНК викликає суттєве зменшення кількості ДНК-синтезуючих клітин, що супроводжується збільшенням ступеня атипізму клітин карциноми Герена.

Ключові слова: проліферативна активність, екзогенна РНК, карцинома Герена.