

Транспорт ионов натрия на ранних этапах дифференцировки клеток нейробластомы человека, индуцированной рекомбинантным интерфероном-альфа 2b (лафероном)

О. М. Рожманова, Е. В. Долгая, Л. Н. Стельмах, Н. Х. Погорелая,
В. В. Кучер, А. В. Миранский, И. С. Магура, Г. Х. Мацука¹

Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины
Ул. Богомольца, 4, Киев, 01024, Украина

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

*Исследовали влияние рекомбинантного интерферона (ИФН)-альфа 2b (лаферона) на транспорт ионов $^{22}\text{Na}^+$ в клетках нейробластомы человека линии IMR 32. Показано, что ИФН-альфа 2b (600 МЕ/мл) к концу первых суток воздействия тормозит пролиферацию и индуцирует морфологическую дифференцировку примерно 50 % культивируемых клеток. Переход клеток в дифференцированное состояние сопровождается изменением потоков ионов натрия через плазматическую мембрану. В первые минуты после воздействия ИФН-альфа 2b входящий поток ионов $^{22}\text{Na}^+$ в недифференцированных клетках уменьшается на 20 % по сравнению с контролем. В этих клетках деполяризация плазматической мембраны смесью вератрина (200 мкг/мл) и токсина скорпиона *Leiurus quinquestriatus* (10 мкг/мл) вызывает увеличение входящего потока ионов $^{22}\text{Na}^+$ на 50 %. В дифференцированных клетках при деполяризации их нейротоксинами входящий поток ионов $^{22}\text{Na}^+$ в 3,2 раза больше, чем в недифференцированных. Тетродотоксин (ТТХ) в концентрации $4 \cdot 10^{-7}$ М полностью блокирует входящий поток в недифференцированных клетках, а в дифференцированных — уменьшает его на 50 %. Вероятно, это свидетельствует о том, что в дифференцированных ИФН-альфа 2b клетках нейробластомы появляются потенциалуправляемые ТТХ-нечувствительные натриевые каналы. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы в первые минуты воздействия ИФН-альфа 2b уменьшается в 2 раза. После 22 ч культивирования клеток в среде, содержащей ИФН-альфа 2b, она восстанавливается до 80 % от контрольного уровня. Полученные *in vitro* данные можно использовать для оценки антипролиферативного действия лаферона *in vivo*.*

Введение. Актуальным направлением современных исследований является изучение нейроиммунных взаимодействий. Важнейшие иммуномодуляторы — интерфероны (ИФН) класса альфа осуществляют контроль роста и пролиферации различных типов клеток, в том числе и клеток нейробластомы, а также регулируют процесс клеточной дифференцировки [1, 2]. Мембранные механизмы, посредством

которых осуществляется внутриклеточное действие ИФН, в настоящее время остаются недостаточно выясненными.

Известно, что ИФН-альфа модулируют механизмы активного и потенциалозависимого транспорта ионов Na^+ . Показано [3], что активность Na^+ , K^+ -АТФазы в мембранах эритроцитов у больных гепатитом уменьшалась в процессе их лечения ИФН-альфа. Мембраносвязанная Na^+ , K^+ -АТФаза участвует в реализации антипролиферативного действия рекомбинантного ИФН-альфа 2a в клетках лимфомы Дауди [4].

© О. М. РОЖМАНОВА, Е. В. ДОЛГАЯ, Л. Н. СТЕЛЬМАХ,
Н. Х. ПОГОРЕЛАЯ, В. В. КУЧЕР, А. В. МИРАНСКИЙ,
И. С. МАГУРА, Г. Х. МАЦУКА, 2000

Результаты наших предыдущих исследований продемонстрировали, что ИФН-альфа 2b изменяет характеристики потенциалуправляемых натриевых каналов в пролиферирующих клетках нейробластомы человека IMR 32 [5] и увеличивает проводимость для ионов Na^+ в этих клетках в процессе их дифференцировки [2].

Целью настоящей работы было изучение потоков ионов Na^+ через мембрану культивируемых клеток нейробластомы человека линии IMR 32 на ранних этапах их дифференцировки, индуцированной ИФН-альфа 2b (лафероном).

Материалы и методы. Рекомбинантный интерферон-альфа 2b человека (коммерческое название препарата лаферон) предоставлен Институтом молекулярной биологии и генетики НАН Украины в виде лиофильно высушенного порошка. Базовый раствор ИФН-альфа 2b (100000 МЕ/мл) готовили разведением порошка стерильным 0,9 %-м раствором NaCl и хранили замороженным при температуре -20°C .

В работе использовали следующие реактивы: токсин скорпиона *Leiurus quinquestriatus* и вератрин фирмы «Merck» (ФРГ). Трис, ЭДТА и додецилсульфат натрия — «Serva» (Германия), тетродотоксин (ТТХ) — «Sankyo» (Япония), оубаин — «Calbiochem» (США), Na_2ATP и бычий сывороточный альбумин (БСА) — «Sigma» (США). Изотоп $^{22}\text{NaCl}$ — ПО «Изотоп» (Россия). Остальные соли квалификации ч. д. а. получены из ПО «Реахим» (Россия).

Культура клеток и условия выращивания. Эксперименты проводили на клетках нейробластомы человека линии IMR 32, любезно предоставленных Институтом цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в монослое во флаконах Карреля (площадь 16 см^2) в среде RPMI 1640 («Sigma») с добавлением 10 %-й термоинактивированной сыворотки крови эмбрионов крупного рогатого скота («Диагностикум», Украина) и 400 мкг/мл гентамицина при температуре 37°C . Исходная плотность клеток при пересеве $5 \cdot 10^4$ — 10^5 клеток/ см^2 . В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста (46 ч культивирования).

Для индукции морфологической дифференцировки через 24 ч после прикрепления клеток к субстрату обычную среду культивирования меняли на среду, содержащую ИФН-альфа 2b (600 МЕ/мл), и выращивали клетки в модифицированной среде в течение 22 ч.

Если в экспериментах использовали суспензию клеток, то от дна флаконов их отделяли 0,02 %-м раствором версена (Московский НИИ вирусных

препаратов, Россия). Количество клеток считали в камере Горяева.

Морфологические исследования клеток IMR 32 осуществляли прижизненно во флаконах Карреля путем фоторегистрации фиксированных участков клеточных культур с помощью инвертированного микроскопа в фазовом контрасте. Размеры сомы клеток оценивали по площади ее видимого профиля (проективная площадь). Площадь профиля и суммарную длину нейритов клеток нейробластомы определяли по фотоизображениям с помощью полуавтоматического анализатора МОР-3 (Германия).

Определение концентрации белка. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [6], используя БСА в качестве стандарта.

Измерение входящего потока $^{22}\text{Na}^+$. При изучении входящего потока натрия в дифференцированных клетках IMR 32 их не снимали со дна флаконов. Контролем служили клетки, культивируемые без ИФН-альфа 2b (недифференцированные клетки). Культуральную среду во всех флаконах меняли на 2 мл раствора 1 (таблица), содержащего 0,5 мг/мл БСА. После этого для измерения потенциалуправляемого ТТХ-чувствительного потока ионов $^{22}\text{Na}^+$ флаконы как с недифференцированными, так и с дифференцированными клетками делили на три группы: 1 — без добавления нейротоксинов; 2 — во флаконы для деполяризации мембраны добавляли вератрин (200 мкг/мл) и токсин скорпиона *L. quinquestriatus* (10 мкг/мл); 3 — во флаконы добавляли вератрин, токсин и блокатор натриевых каналов ТТХ ($4 \cdot 10^{-7}$ М).

Для связывания нейротоксинов с плазматической мембраной клетки преинкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C [7]. Затем во все флаконы добавляли 1 мл раствора 2 (таблица), содержащего 1,5—2 мкКи $^{22}\text{NaCl}$, и инкубировали на протяжении 20 мин (37°C). После этого раствор, содержащий нейротоксины и ионы $^{22}\text{Na}^+$, сливали и трижды промывали клетки в каждом флаконе 3 мл раствора 3 (таблица) для удаления того изотопа $^{22}\text{Na}^+$, который не вошел в клетки. Затем в каждый флакон вносили по 3 мл 0,1 н NaOH, перемешивали и выдерживали при температуре 60°C до полного растворения клеток. Отбирали аликвоты для определения концентрации белка и измерения радиоактивности в сцинтилляционной жидкости ЖС-103 на счетчике «Rackbeta» (Швеция). Входящий поток ионов $^{22}\text{Na}^+$ рассчитывали в $\text{имп} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{клетка}^{-1}$.

В недифференцированных клетках входящий поток $^{22}\text{Na}^+$ в первые минуты после воздействия ИФН-альфа 2b меряли, как описано выше. В этих

Состав растворов, использованных при изучении транспорта ионов $^{22}\text{Na}^+$ (1–3), получении микросом (4, 5) и определении активности Na^+ , K^+ -АТФазы (6)

Состав раствора	Концентрация, мМ					
	Порядковый номер раствора					
	1	2	3	4	5	6
NaCl	—	30	—	—	—	100
KCl	5	5	—	—	—	10
CaCl ₂	—	—	2	—	—	—
MgCl ₂	1	1	1	—	—	2
Глюкоза	5	5	5	—	—	—
Холинхлорид	143	113	143	—	—	—
Трис-НСl (рН 7,4)	10	10	10	10	10	50
Сахароза	—	—	—	300	—	—
Na ₂ АТФ	—	—	—	—	—	2
ЭДТА	—	—	—	1	1	—
Оуабаин	—	$3 \cdot 10^{-3}$	—	—	—	—

экспериментах использовали клетки, культивируемые в течение 46 ч без ИФН. ИФН-альфа 2b (600 МЕ/мл) добавляли в половину флаконов одновременно с изотопом $^{22}\text{Na}^+$ и инкубировали клетки в его присутствии заданное время при 37 °С. В качестве контроля использовали клетки, к которым не добавляли ИФН-альфа 2b.

Определение активности Na^+ , K^+ -АТФазы. Активность фермента определяли во фракции плазматических мембран клеток нейробластомы. Для получения этой фракции снятые со дна флаконов клетки ($2 \cdot 10^7$) трижды отмывали от культуральной среды центрифугированием (400·g, 10 мин) раствором 4 (таблица). Затем клетки ресуспендировали в растворе 5 (таблица) и оставляли в этом же растворе в течение 10 мин при температуре 20 °С для осмотического лизиса. Подвергнутые лизису клетки гомогенизировали в ручном гомогенизаторе с тefлоновым поршнем, а затем центрифугировали (10000·g, 20 мин) при 4 °С для осаждения ядерной и митохондриальной фракций. Микросомную фракцию выделяли из надосадочной жидкости центрифугированием (150000·g, 1 ч). Полученный осадок ресуспендировали и гомогенизировали в растворе 5 (таблица). Микросомный препарат хранили замороженным при температуре -20 °С.

Микросомы (100 мкг белка/мл) преинкубировали в течение 5 мин с ИФН-альфа 2b (600 МЕ/мл) при 37 °С в растворе 5 (таблица).

Затем определяли общую активность фермента в среде 6 (таблица). Реакцию проводили в течение 5 мин при 37 °С и останавливали ее, добавляя додецилсульфат натрия до его конечной концентрации в пробах 0,2 %. Активность Mg^{2+} -АТФазы определяли в той же реакционной среде в присутствии оуабаина (10^{-5} М). Активность Na^+ , K^+ -АТФазы рассчитывали, как разность общей и Mg^{2+} -АТФазной активностей. Неорганический фосфат определяли по методу Фиске—Суббару [8] и выражали в мкМ $\text{P}_{\text{неорг}}$ · (мг белка)⁻¹ · ч⁻¹. Для недифференцированных клеток в качестве контроля использовали микросомы, не обработанные ИФН-альфа 2b; для дифференцированных клеток — микросомы, полученные из клеток, культивируемых в среде без добавления ИФН-альфа 2b.

Статистический анализ экспериментальных данных. Серия экспериментов включала 3—5 опытов (указано в подписях к рисункам). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS v8.0. Данные представлены, как средние арифметические ± стандартная ошибка среднего арифметического. Для определения достоверности различий при сравнении средних значений использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными, если $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Индукция морфологической дифференцировки в клетках IMR 32. Ранее мы обнаружили, что ИФН-альфа 2b *in vitro*

вызывает морфологическую дифференцировку клеток нейробластомы человека IMR 32 [2]. К концу первых суток воздействия ИФН тормозит деление не всех клеток. Необходимо было количественно оценить соотношение пролиферирующих и прекративших деление клеток IMR 32, поскольку неоднородность популяции следует учитывать при анализе потоков ионов через плазматическую мембрану клеток и расчете активности мембраносвязанных ферментов.

В качестве критерия морфологической дифференцировки использовали следующие общепринятые для нервных клеток параметры: снижение пролиферативной активности клеток, увеличение общей длины нейритов и изменение проективной площади сомы. Как показали наши исследования, через 22 ч после добавления ИФН-альфа 2b (600 МЕ/мл) в культуральную среду (46 ч культивирования) часть клеток прекращала деление, и их количество во флаконе уменьшалось на 40 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 1). В качестве контроля использовали клетки, выращиваемые в течение 46 ч в среде, не содержащей ИФН.

Фенотип прекративших деление клеток изменялся к концу первых суток от начала воздействия ИФН-альфа 2b. По нашим данным, проективная площадь их сомы была в среднем на 56 % ($p < 0,05$) больше, чем у контрольных клеток (рис. 2, а). Средняя суммарная длина нейритов достоверно не отличалась ($p > 0,05$) от аналогичного параметра в контрольной группе (рис. 2, б). Достоверное отличие их длины наблюдали через 48 ч от начала воздействия ИФН-альфа 2b.

Наряду с изменением морфологических параметров обнаружено усиление синтеза белка в клетках IMR 32. К концу первых суток культивирования клеток с ИФН-альфа 2b как общая концентрация белка в клетке, так и концентрация белка в мембранной фракции была в среднем в 2,3 раза ($p < 0,001$) выше, чем в контроле (рис. 2, в). Аналогичный эффект наблюдали в клетках меланомы человека NMV-1 под влиянием ИФН-бета [9].

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что ИФН-альфа 2b к концу первых суток своего воздействия *in vitro* тормозит пролиферацию и индуцирует морфологическую дифференцировку примерно 50 % культивируемых клеток IMR 32. Эти данные хорошо согласуются с обнаруженным ранее антипролиферативным действием ИФН-альфа 2a в клетках нейробластомы человека линии T98G [10].

Влияние ИФН-альфа 2b на входящий поток

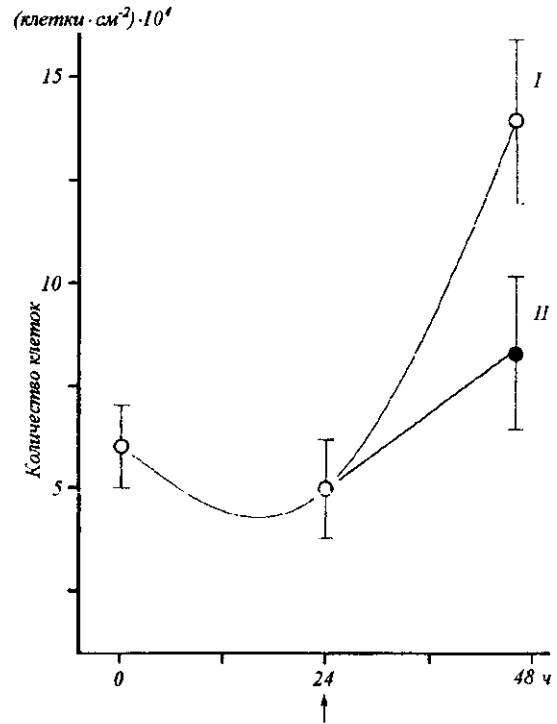


Рис. 1. Влияние ИФН-альфа 2b на количество клеток нейробластомы человека IMR 32. Клетки культивировали в отсутствие (I) или в присутствии (II) ИФН-альфа 2b (600 МЕ/мл) указанное время. Момент внесения ИФН-альфа 2b в культуральную среду отмечен стрелкой. Приведены средние значения пяти экспериментов по три независимых измерения в каждом, $p < 0,05$

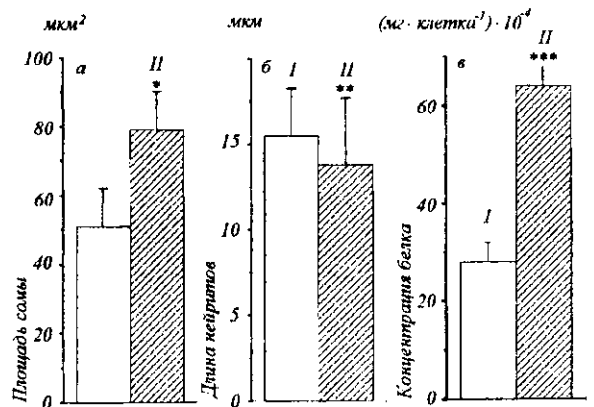


Рис. 2. Влияние ИФН-альфа 2b на проективную площадь сомы (а), среднюю суммарную длину нейритов (б) и концентрацию белка в мембранной фракции (в) клеток нейробластомы человека IMR 32 через 22 ч от начала воздействия: I — контроль; II — ИФН-альфа 2b (600 МЕ/мл); а, б — приведены средние значения 40 независимых измерений, * $p < 0,05$, ** $p > 0,05$; в — приведены средние значения трех экспериментов по два независимых измерения в каждом, *** $p < 0,001$

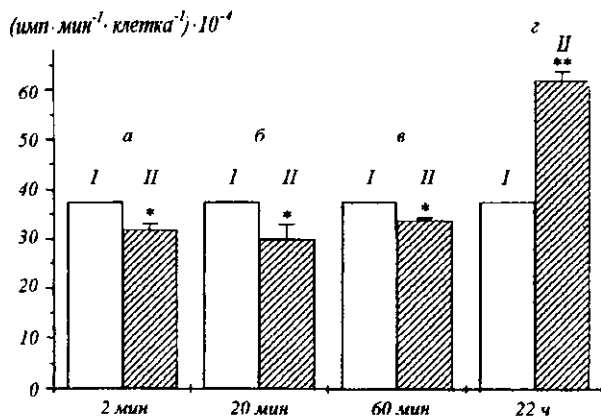


Рис. 3. Влияние ИФН-альфа 2b на входящий поток ионов $^{22}\text{Na}^+$ в недифференцированных клетках нейробластомы человека IMR 32 в различные моменты времени от начала воздействия: I — контроль; II — ИФН-альфа 2b (600 МЕ/мл); а—в — приведены средние значения двух экспериментов по три независимых измерения в каждом, * $p < 0,05$; г — приведены средние значения четырех экспериментов по три независимых измерения в каждом, ** $p < 0,001$

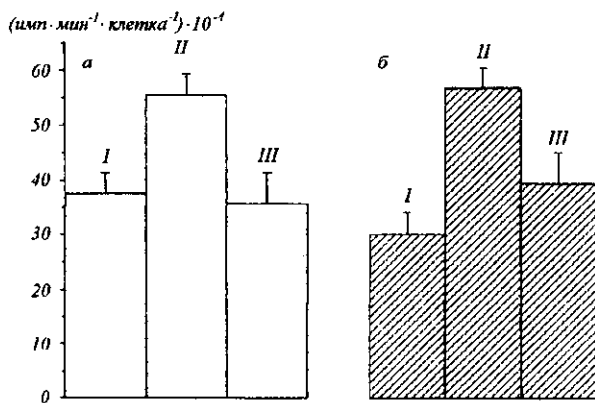


Рис. 4. Влияние деполяризации на входящий поток ионов $^{22}\text{Na}^+$ в клетках нейробластомы человека IMR 32, инкубируемых в среде в отсутствие (а) и в присутствии (б) ИФН-альфа 2b (600 МЕ/мл) в течение 20 мин (недифференцированные клетки). Плазматическую мембрану деполяризовали путем преинкубации клеток в течение 30 мин в среде, содержащей вератрин (200 мкг/мл) и токсин скорпиона *L. quinquestratus* (10 мкг/мл). I — без нейротоксинов; II — вератрин + токсин скорпиона; III — вератрин + токсин скорпиона + тетродотоксин ($4 \cdot 10^{-7}$ М). Приведены средние значения трех экспериментов по три независимых измерения в каждом, $p < 0,05$

ионов $^{22}\text{Na}^+$. Для разделения входящего и выходящего потоков ионов натрия использовали оубаин (10^{-5} М), блокирующий активный перенос ионов натрия из клетки во внеклеточную среду. В первые минуты воздействия ИФН-альфа 2b (600 МЕ/мл) уменьшал входящий поток ионов $^{22}\text{Na}^+$ в недифференцированных клетках примерно на 20 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 3, а—в). К концу первых суток воздействия ИФН-альфа 2b, когда у 50 % культивируемых клеток наблюдали признаки морфологической дифференцировки, поток $^{22}\text{Na}^+$ увеличивался. В дифференцированных ИФН-альфа 2b клетках он был на 65 % больше ($p < 0,05$), чем в контрольных (рис. 3, г).

Вератрин в присутствии токсина скорпиона *L. quinquestratus* вызывал деполяризацию плазматической мембраны клеток нейробластомы [11]. В наших экспериментах в течение первых 20 мин в присутствии указанных нейротоксинов входящий поток $^{22}\text{Na}^+$ увеличивался примерно на 50 % ($p < 0,05$) в контрольных и на 70 % ($p < 0,05$) — в стимулированных ИФН клетках. Этот поток достоверно ($p < 0,05$) блокировался ТТХ в концентрации $4 \cdot 10^{-7}$ М (рис. 4). Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в недифференцированных клетках IMR 32 входящий поток ионов натрия осуществляется по потенциалуправляемым ТТХ-чувствительным натриевым каналам. Уменьшение этого потока в первые минуты действия ИФН-альфа 2b, по-видимому, связано с изменением потенциалозависимости механизмов, управляющих натриевой проводимостью [5].

В деполяризованных нейротоксинами дифференцированных клетках нейробластомы входящий поток ионов натрия через 22 ч от начала воздействия ИФН-альфа 2b был в 3,2 раза больше ($p < 0,05$), чем в недифференцированных клетках (рис. 5). Эти данные хорошо согласуются с обнаруженным в электрофизиологических исследованиях увеличением плотности ТТХ-чувствительного натриевого тока в дифференцированных клетках нейробластомы человека линий IMR 32 [2] и SY-SY5Y [12].

Как следует из данных, представленных на рис. 5, а, ТТХ полностью ($p < 0,001$) блокировал входящий поток в недифференцированных клетках. В дифференцированных ИФН-альфа 2b клетках (рис. 5, б) указанный поток под влиянием ТТХ уменьшался на 50 % ($p < 0,001$). Вероятно, это свидетельствует о том, что в процессе дифференцировки, индуцированной ИФН-альфа 2b, в плазматической мембране клеток IMR 32 появляются потенциалозависимые ТТХ-нечувствительные натриевые каналы.

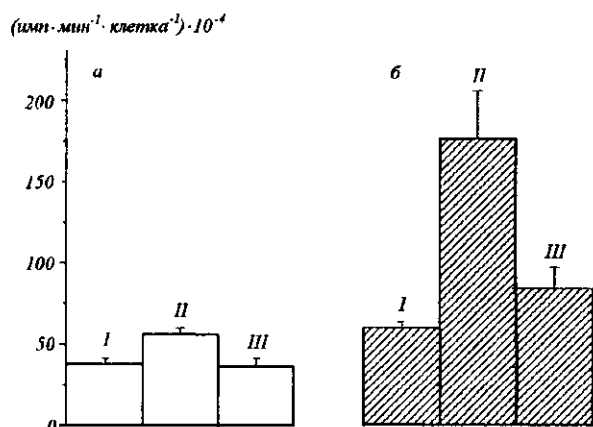


Рис. 5. Влияние деполяризации на входящий поток ионов $^{22}\text{Na}^+$ в клетках нейробластомы человека IMR 32, культивируемых в среде в отсутствие (а) и в присутствии (б) ИФН-альфа 2b (600 МЕ/мл) в течение 22 ч (дифференцированные клетки). Плазматическую мембрану клеток деполяризовали нейротоксинами так же, как указано на рис. 4. I — без нейротоксинов; II — вератрин + токсин скорпиона *L. quinquestratus*; III — вератрин + токсин скорпиона + тетродотоксин ($4 \cdot 10^{-7}$ М). Приведены средние значения трех экспериментов по три независимых измерения в каждом, $p < 0,05$

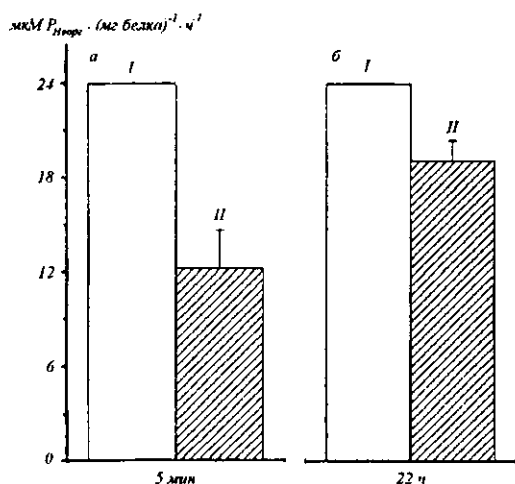


Рис. 6. Влияние ИФН-альфа 2b на активность Na^+, K^+ -АТФазы в клетках нейробластомы человека IMR 32 через 5 мин (а) и 22 ч (б) от начала воздействия: I — контроль; II — ИФН-альфа 2b (600 МЕ/мл). Приведены средние значения трех экспериментов по три независимых измерения в каждом, $p < 0,001$

Влияние ИФН-альфа 2b на активность Na^+, K^+ -АТФазы. Выходящий из клетки поток ионов натрия, ингибируемый оубаином, относится к транспорту через Na^+, K^+ -АТФазную систему. Как

показали наши исследования, ИФН-альфа 2b уменьшал активность Na^+, K^+ -АТФазы в пролиферирующих клетках IMR 32 уже в первые минуты после связывания со специфическими рецепторами на поверхности плазматической мембраны. Через 5 мин после начала воздействия ИФН-альфа активность фермента была в 2 раза меньше ($p < 0,001$), чем в контроле (рис. 6, а). К концу первых суток культивирования клеток IMR 32 в среде, содержащей ИФН-альфа 2b, активность Na^+, K^+ -АТФазы восстанавливалась до 80 % ($p < 0,001$) относительно контрольного уровня (рис. 6, б). Поскольку активация Na^+, K^+ -АТФазной системы в G_1 фазе является важным условием для полного цикла размножения клетки [13], можно предположить, что обнаруженное первоначальное уменьшение активности Na^+, K^+ -АТФазы — один из факторов, обуславливающих переход пролиферирующих клеток в G_0 фазу. В пользу такого предположения свидетельствует и тот факт, что антипролиферативный эффект рекомбинантного ИФН-альфа 2a в клетках лимфомы Дауди по крайней мере частично обусловлен значительным уменьшением фосфорилирования Na^+, K^+ -АТФазы [4].

Полученные в настоящей работе данные позволяют сделать вывод о том, что медиатор иммунной системы ИФН-альфа 2b модулирует транспорт ионов Na^+ на ранних этапах дифференцировки клеток нейробластомы человека IMR 32. Эти результаты подтверждают наличие тесной взаимосвязи между иммунной и нервной системами. Они важны для понимания механизмов нейротропного действия ИФН-альфа 2b. Работа имеет важное практическое значение, поскольку в своих исследованиях мы использовали отечественный рекомбинантный ИФН-альфа 2b (лаферон), широко применяемый в клинике. Данные, полученные нами *in vitro*, можно использовать для оценки антипролиферативной активности лаферона *in vivo*.

Работа поддержана Государственным Фондом Фундаментальных Исследований Украины (грант 5.4/321).

О. М. Рожманова, О. В. Долга, Л. М. Стельмах, Н. Х. Погорсла, В. В. Кучер, А. В. Міранський, І. С. Магура, Г. Х. Мацука

Транспорт іонів натрію на ранніх етапах диференціювання клітин нейробластоми людини, індукованої рекомбінантним інтерфероном-альфа 2b (лафероном)

Резюме

Досліджували вплив рекомбінантного інтерферону (ІФН)-альфа 2b (лаферону) на транспорт іонів $^{22}\text{Na}^+$ в клітинах нейробластоми людини лінії IMR 32. Показано, що ІФН-альфа 2b (600 МЕ/мл) наприкінці першої доби дії гальмував про-

ліферацію та викликав морфологічне диференціювання принаймні 50 % культивованих клітин. Перехід клітин у диференційований стан супроводжувався зміною потоків іонів натрію через плазматичну мембрану. В перші хвилини після дії ІФН-альфа 2b вхідний потік іонів $^{22}\text{Na}^+$ в недиференційованих клітинах зменшувався на 20 % порівняно з контролем. У цих клітинах деполаризація плазматичної мембрани, обумовлена внесенням вератрину (200 мкг/мл) та токсину скорпіна *Leiurus quinquestriatus* (10 мкг/мл), призводила до збільшення вхідного потоку іонів $^{22}\text{Na}^+$ на 50 %. У диференційованих клітинах при деполаризації їх нейротоксинами вхідний потік іонів $^{22}\text{Na}^+$ був у 3,2 рази більшим, ніж у недиференційованих. Тетродотоксин (ТТХ) у концентрації $4 \cdot 10^{-7}$ М повністю блокував вхідний потік у недиференційованих клітинах. У диференційованих клітинах вказаний потік під впливом ТТХ зменшувався на 50 %. Це є свідченням того, що в процесі диференціювання, індукованого ІФН-альфа 2b, у плазматичних мембранах клітин IMR 32 з'являються потенціалзалежні нечутливі до ТТХ натрієві канали. Активність Na^+ , K^+ -АТРази в перші хвилини дії ІФН-альфа 2b зменшувалися у 2 рази порівняно з контролем. Протягом першої доби від початку дії ІФН-альфа 2b активність ферменту відновлювалася і складала 80 % від контрольного рівня. Отримані *in vitro* дані дають можливість наблизитися до розуміння механізмів нейроімунної взаємодії та оцінки антипроліферативної дії лаферону *in vivo*.

O. M. Rozhmanova, E. V. Dolgaya, L. N. Stelmakh,
N. Kh. Pogorelaya, V. V. Kucher, A. V. Miransky, I. S. Magura,
G. Kh. Matsuka

Sodium transport in the human neuroblastoma cells during early phase of differentiation with recombinant interferon-alpha 2b

Summary

We investigated the sodium transport induced by the recombinant interferon (IFN)-alpha 2b (laferon) in the human neuroblastoma cell line IMR 32. It has been found that IFN-alpha 2b (600 IU/ml) inhibited cell proliferation and induced morphological differentiation in 50 % of these cells by the end of the first day of incubation. This process was accompanied by an alteration in the ionic transport across the cell membrane. We have demonstrated that in undifferentiated cells, IFN-alpha 2b decreased $^{22}\text{Na}^+$ influx by 20 % compared to the control cells. The membrane depolarization in these cells, induced by veratrine (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence of *Leiurus quinquestriatus* venom (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), increased $^{22}\text{Na}^+$ influx by 50 %. In the depolarized differentiated cells, $^{22}\text{Na}^+$ influx was 3.2 times larger than in the depolarized undifferentiated cells. Tetrodotoxin ($4 \cdot 10^{-7}$ M) completely blocked $^{22}\text{Na}^+$ influx in the depolarized undifferentiated cells and reduced this influx by 50 % in the depolarized differentiated cells. These data indicate that voltage-operated tetrodotoxin-insensitive sodium channels are expressed in the neuroblastoma cells after the differentiation by IFN-alpha 2b. The Na^+ , K^+ -ATPase activity has decreased by half within 5 minutes of the IFN-alpha 2b addition. The enzyme activity increased up to 80 % of the control level after 22 h of exposure to IFN-alpha 2b. The *in vitro* data encouraged pilot studies to evaluate the *in vivo* antiproliferative effect of laferon.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ

- Rossi Giovanni B. Interferon and cell differentiation // Interferon.—1985.—6.—Р. 31—68.
- Вятченко-Карпинский С. В., Погорелая Н. Х., Магура И. С., Рожманова О. М., Квасюк В. И., Михайлопуло И. А. Индукция морфологической дифференцировки и модуляция ионных каналов, вызываемые $\alpha 2$ -интерфероном и олигоденилатами в клетках нейробластомы // Нейрофизиология.—1995.—27, № 3.—С. 199—207.
- Kuralay F., Tanyalcin T., Kutay F., Ersoz G., Yuce G., Batur Y. The effect of interferon therapy on erythrocyte membrane Na^+ , K^+ -ATP activity in patients with chronic hepatitis B and C virus infections // Biochem. Mol. Biol. Int.—1998.—45, N 6.—Р. 1189—1198.
- Yokoyama M., Koike K., Kanno S., Ohtsuki K. Biochemical characterization of the membrane-associated phosphorylating proteins involved in the anti-proliferative effect of human recombinant interferon-alpha 2a (rIFN-alpha 2a) in Daudi cells // Tohoku J. Exp. Med.—1990.—160, N 4.—Р. 343—359.
- Кучер В. В., Магура И. С., Рожманова О. М., Долгая Е. В., Погорелая Н. Х. Действие рекомбинантного интерферона альфа 2b (лаферона) на потенциалуправляемую натриевую проводимость клеток IMR 32 // Роль нейромедиаторов и регуляторных пептидов в процессах жизнедеятельности.—Минск: 1999.—С. 306—307.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr L. A., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—193, N 2.—Р. 265—275.
- Catterall W. A. Activation of the action potential sodium ionophore of cultured neuroblastoma cells by veratridine and batrachotoxin // J. Biol. Chem.—1975.—250, N 8.—Р. 4053—4059.
- Fiske C. H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem.—1925.—66.—Р. 375—400.
- Nagao S., Tohgo A., Kohno M., Ogawa H. Cytostatic action of human fibroblast interferon in direct growth inhibition: effect on human malignant melanoma // Gann.—1983.—74, N 3.—Р. 452—458.
- Hannigan G. E., Fish E. N., Williams B. R. Modulation of human interferon-alpha receptor expression by human interferon-gamma // J. Biol. Chem.—1984.—259, N 13.—Р. 8084—8086.
- Sorrentino G., Monsurro M. R., Singh I. N., Kanfer J. N. Membrane depolarization in LA-N-1 cells. The effect of maitotoxin is Ca^{2+} - and Na^+ -dependent // Mol. Chem. Neuro-pathol.—1997.—30, N 3.—Р. 199—211.
- Toselli M., Tosetti P., Taglietti V. Functional changes in sodium conductances in the human neuroblastoma cell line SY-SY5Y during *in vitro* differentiation // J. Neurophysiol.—1996.—76, N 6.—Р. 3920—3927.
- Веренинов А. А., Марахова И. И. Транспорт ионов у клеток в культуре.—Л.: Наука, 1986.—С. 292.

УДК 577.352

Поступила в редакцию 24.04.2000