

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

Государственное учреждение
«Научно-производственный центр
«Институт фармакологии и биохимии
Национальной академии наук Беларуси»

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ
И КЛИНИЧЕСКАЯ
ФАРМАКОЛОГИЯ**

**МАТЕРИАЛЫ
МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ
КОНФЕРЕНЦИИ**

Гродно, 29-30 сентября 2011 г.

Гродно
2011

УДК 577.1:615(063)

Редакционная коллегия:
П.С. Пронько, П.Т. Петров, В.А. Аверин

Экспериментальная и клиническая фармакология: Материалы международной научной конференции / Отв. ред.: Пронько П.С. – Гродно: 29-30 сентября 2011 г.– Гродно: 2011.– 276 с.

В сборнике представлены материалы международной научно-практической конференции «Экспериментальная и клиническая фармакология», отражающие результаты исследований ученых из Беларуси, России и Казахстана.

Материалы конференции представляют интерес для фармакологов, биохимиков, физиологов, медицинских работников и организаторов здравоохранения, специалистов в области производства лекарственных препаратов, а также аспирантов и студентов факультетов медико-биологического профиля.

УДК 577.1:615(063)

© Коллектив авторов, 2011
© Государственное учреждение
«Научно-производственный центр
«Институт фармакологии и биохимии
Национальной академии наук Беларуси»,
2011

ПРОЯВЛЕНИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА СТРЕПТОКИНАЗЫ В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ Cu^{2+} и Zn^{2+}

О.Н. Жук, Е.Ф. Полукошко, В.Н. Никандров

*Институт физиологии НАН Беларуси, 220072 Беларусь, Минск, ул. Академическая, 28;
E-mail: nadulich@mail.ru*

В осуществлении регуляции функциональной активности клеток нервной ткани участвует обширная группа белков, влияющих на жизнедеятельность клеток опосредованно, вызывая многоплановые и глубокие изменения метаболизма, функций и структуры клеток и тканей.

Изучение биологии клеток нервной ткани привело к открытию новых свойств компонентов системы «плазминоген–плазмин», которая вначале вызывала интерес только с позиции ее значения для процессов фибринолиза. В настоящее время доказано, что эта система участвует в осуществлении реакций перичеселлюлярного протеолиза, обеспечивающих перестройку межклеточного матрикса, модификацию мембранных рецепторов и активацию предшественников факторов роста и других биологически активных молекул.

В нашей лаборатории на органотипических, диссоциированных культурах нервной ткани (кора головного мозга, вегетативные и чувствительные ганглии), перевиваемых линиях клеток глиомы С6, нейробластомы IMR-32, феохромоцитомы РС12 было впервые продемонстрировано нейротрофическое действие сильнейшего активатора плазминогена – стрептокиназы (СК), выражающееся в стимуляции пролиферации клеток, процессов внутриклеточного метаболизма, разрастания нейритов, протекторном действии при повреждающем влиянии ионов аммония, марганца, холодового стресса, анионной формы АТФ, а в отдельных случаях – дифференциации клеток [1–5].

Было показано, что нейротрофический эффект другого регуляторного белка – плазминогена существенно зависит от функционально-метаболического состояния самих клеток нервной ткани, который может, по-видимому, заметно изменяться в присутствии других эффекторов [6]. Однако до сих пор в отношении СК в литературе нет ни одного сообщения подобного характера.

Между тем, значение его чрезвычайно велико, поскольку логически предполагает значимые изменения характера действия СК при функционально-метаболических перестройках клеток нервной ткани, включая внутриклеточные структуры. Среди факторов метаболической регуляции для нервной ткани важную роль играют ионы меди и цинка. Они входят в состав Cu , Zn – супероксиддисмутазы, а ионы меди – также и в состав цитохром С-оксидазы, контролируя таким образом перевод супероксид-анионов в менее токсичный гидропероксид, интенсивность терминального звена цепи тканевого дыхания. Супероксидконвергирующей способностью обладает и СК. Поэтому представляет большой научный и практический интерес исследование их совместного воздействия на клетки нервной ткани.

Целью работы явилось выявление особенностей нейротрофического действия СК в присутствии ионов Cu^{2+} или Zn^{2+} .

Материалы и методы. Исследования проведены на органотипических культурах коры головного мозга новорожденных крыс, выращенных на покрытых коллагеном стеклышках, помещенных в чашки Петри, в ростовой среде. В качестве последней в первые 1–3 сут использовали среду DMEM, содержащую 20% телячьей эмбриональной

сыворотки крови (ТС), 6 г/л глюкозы и антибиотики (гентамицин или пенициллин+стрептомицин). Затем культуры переводили на ростовую среду, содержащую 10 или 0,5% ТС, в зависимости от условий эксперимента.

Чашки с культурами помещали в CO₂ – инкубатор при температуре 37 °С. Смену питательной среды проводили дважды в неделю.

Проведено 6 серий экспериментов.

Контрольная серия: за сутки до опыта для исключения влияния на исследуемые показатели белков сыворотки крови, культуры переводили на питательную среду, содержащую 0,5% ТС.

Опытные серии: **а** – в питательную среду, содержащую 0,5% ТС, добавляли CuSO₄ (10⁻⁷–10⁻⁵ М); **б** – в питательную среду, содержащую 0,5% ТС, добавляли 10⁻⁷–10⁻⁵ М CuSO₄ а также 20 или 2000 МЕ/мл ; SK **в** – в питательную среду, содержащую 0,5% ТС, добавляли ацетат цинка – Zn(CH₃COO₂·2H₂O (10⁻⁸ – 10⁻⁶ М); **г** – в питательную среду, содержащую 0,5% ТС, вводили 10⁻⁸ – 10⁻⁶ М ацетата цинка, а также 20 или 2000 МЕ/мл SK ; **д** – в питательную среду, содержащую 0,5% ТС, добавляли 20 или 2000 МЕ/мл SK.

Количество исследованных культур в каждой серии составило ≥ 19.

В работе использовали питательную среду DMEM, эмбриональную телячью сыворотку крови, трипсин, коллагеназу (Sigma, США), SK (РУП «Белмедпрепараты»). Остальные реактивы были производства стран СНГ.

Жизнеспособность культур определяли с помощью прижизненной микроскопии, а также после окрашивания препаратов трипановым синим. Морфометрические измерения в исследуемых культурах проводили на микроскопе «Leica DM1000-3000» (Германия) с помощью компьютерной программы IM 1000, Jmaige J, версия 1.38.

Для электронно-микроскопического анализа культуры готовили по стандартной методике [7]: фиксировали вначале в 3% забуференном растворе глутарового альдегида, затем в 1% растворе четырехоксида осмия. После дегидратации в спиртах восходящей крепости материал заключали в аралдит. Ультратонкие срезы готовили на микротоме LKB III (Швеция), контрастировали цитратом свинца и анализировали на электронном микроскопе JEM-100 В (Япония).

Результаты и их обсуждение. Судя по результатам прижизненной микроскопии, в течение 48 ч эксплантаты неокортекса крысы прикреплялись к коллагеновой подложке и начали формировать зону роста, которая к 8–10 сут состояла из радиально направленных отростков клеток, клеток нейроглии и фибробластов. В эксплантатах просматривались отдельные нейроны с крупными центрально расположенными ядрами, некоторые нейроны мигрировали в зону роста.

Добавление CuSO₄ в концентрации 10⁻⁵–10⁻⁶ М в дефицитную по белкам сыворотки крови (0,5% ТС) питательную среду через 3 ч не вызвало видимых изменений в развитии культур по сравнению с контролем. Изменения отмечены через 12 ч после внесения ионов меди: жизнеспособность культур снижалась, в монослое органных культур наблюдалось сжатие отдельных клеток и увеличение размеров межклеточного пространства. Ядра таких клеток сдвигались на периферию, а в цитоплазме отмечались множественные мелкие вакуоли. При концентрации CuSO₄ 10⁻⁷ М зона роста у всех культур развивалась успешно, она превосходила по качественным показателям зону роста контрольных культур.

Внесение SK в концентрации 2000 или 20 МЕ/мл в питательную среду, содержащую 10⁻⁵ М CuSO₄, не препятствовало развитию деструктивных процессов, инициируемых ионами меди. Зона роста сжималась, эксплантаты отрывались от подложки и всплывали. Оставшиеся прикрепленные к подложке клетки поглощали краситель трипановый синий, демонстрируя нарушение целостности их плазматических мембран. При концентрации CuSO₄ 10⁻⁶ М выявлен частичный защитный эффект SK (2000 или 20 МЕ/мл) при повреждающем действии ионов меди. При добавлении SK в обеих концентрациях в среду, содержащую 10⁻⁷ М CuSO₄, зона роста у всех культур превосходила по качественным

показателям зоны роста и культур контроля и формируемую органотипическими культурами при влиянии одного сульфата меди (10^{-7} М). Отмечено обильное заселение зоны роста клетками глиальной природы. Они выпускали отростки, которые ветвились и образовывали контакты. Электронномикроскопические исследования эксплантатов показали, что перевод 12 сут органотипических культур коры головного мозга новорожденных крыс на дефицитную по белкам сыворотки крови питательную среду приводил к деструктивным изменениям практически во всех клетках и в нейропиле. Эти изменения выражались в появлении миелиноподобных структур в цитоплазме, невыевляемости основных органелл клеток, изменении контура ядер с появлением впячиваний и лопастей.

Добавление Cu^{2+} в концентрации 10^{-5} М в дефицитной по сыворотке крови питательной среде усугубляло деструкцию нервных и глиальных клеток. В то же время внесение Cu^{2+} 10^{-7} М обеспечило сохранность мембранных структур клеток, включая аппарат Гольджи, и способствует увеличению количества митохондрий. Совместное введение в питательную среду ионов меди (10^{-6} М) и SK в концентрации 2000 МЕ/мл препятствовало развитию деструктивных процессов, инициируемых ионами меди в этой концентрации. При хорошей сохранности мембранных структур выявлено увеличение количества митохондрий в клетках, что можно рассматривать как свидетельство активации ряда метаболических процессов в клетках..

SK в концентрации 20 МЕ/мл также обусловила увеличение количества митохондрий в клетке, но в меньшей степени. В клетках обнаруживались также признаки дегенеративных изменений.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ионы меди влияют на жизнедеятельность клеток нервной ткани. Это зависит от характера контакта эффектора с клеткой. В случае непосредственного контакта с клеточной поверхностью в зоне роста органотипической культуры благоприятный эффект выявлен при минимальной концентрации сульфата меди. Воздействие же эффектора через толщу эксплантата на клетки более глубоких слоев (скорее всего опосредованное) обусловило благоприятный для жизнедеятельности клеток эффект при большей концентрации – 10^{-6} М. SK оказало защитное влияние на клетки зоны роста в обеих концентрациях, тогда как в отношении клеток глубоких слоев эксплантата этот эффект более выражен при максимальной концентрации SK.

Внесение в питательную среду ионов цинка в концентрации 10^{-8} М резких отличий состояния культур по отношению к контролю не наблюдалось. Эксплантаты продолжали развиваться, увеличивалась зона роста, глиальные клетки продолжали дифференцироваться, испуская отростки, образующие контакты между. Увеличение концентрации ионов цинка в ростовой среде на один порядок приводило к частичной деструкции клеток неокортекста в течение 72 ч. При концентрации ацетата цинка в питательной среде 10^{-6} М уже спустя 24 ч многие эксплантаты чернели и отклеивались от подложки, зона роста резко сжималась, все эксплантаты в культуре погибали. Воздействие ацетата цинка в концентрации 10^{-6} М приводило к дегенеративным изменениям не только в зоне роста, которая сформирована главным образом отростками нервных и ненервных элементов коры головного мозга и мигрировавшими за пределы эксплантата глиальными клетками, но и в самом эксплантате, что выявлено при электронномикроскопических исследованиях.

Отдельным дегенеративным изменениям подвергались нейроны и глиальные клетки и при концентрации цинка 10^{-8} М – в них происходила дезорганизация мембранных компонентов.

Одновременное же с цинком (10^{-7} – 10^{-8} М) внесение 20 или 2000 МЕ/мл SK позволило сохранить структурную организацию клеток – ядра очерчены, хроматин распределен равномерно, отслоений наружной ядерной мембраны от внутренней не наблюдается. Хорошо сохранены мембранные компоненты цитоплазмы – аппарат

Гольджи, эндоплазматический ретикулум, хотя в некоторых клетках можно видеть небольшое расширение его просветов, сохранены митохондрии, в цитоплазме полисомы распределены равномерно. Однако в некоторых нейронах имеются электронноплотные включения с зернистым содержимым. Иногда встречаются нейроны, в цитоплазме которых выявляются мембранные комплексы, напоминающие распадающуюся миелиновую оболочку и свидетельствующие об изменении функциональной активности нейрона. При этом увеличилась площадь и плотность зоны роста культур, что дает основания расценивать данный эффект как усиление нейротрофического действия СК.

Однако даже в максимальной концентрации СК не предотвращала деструкцию клеток, вызванную ацетатом цинка в концентрации 10^{-6} М.

Примечательно, что при на обогащенной сывороткой крови (10%) питательной среде добавление СК в указанных выше концентрациях и 10^{-8} М Zn^{2+} , существенно усиливало рост, развитие и дифференцировку клеток органотипических культур неокортекса, достоверно увеличивался индекс площади зоны роста.

Заключение. Результаты проведенных исследований, прежде всего, дополнительно демонстрируют наличие у стрептокиназы нейротрофической активности, что четко проявилось в существенном улучшении морфологического статуса клеток коры головного мозга. Это обстоятельство диктует необходимость проведения дальнейших многоплановых исследований ее воздействия на различных морфологических структурах головного мозга, включая патологически измененные клетки.

Более того, в присутствии стрептокиназы частично снимался повреждающий эффект ионов меди и цинка в цитотоксических концентрациях. Этот момент раскрывает еще один важный в прикладном аспекте ракурс проблемы – универсальность протекторного эффекта стрептокиназы. Ранее таковой был продемонстрирован на целом ряде повреждающих факторов различной природы.

Вся совокупность полученных нами материалов свидетельствует о насущной необходимости дальнейшего изучения эффектов стрептокиназы на молекулярно-клеточном уровне (фундаментальный аспект) и развертывания работ по созданию схем применения стрептокиназы при патологии неврологического плана (прикладной аспект). Эти два аспекта выливаются в самостоятельные объемные проблемы, требующие привлечения специалистов различного профиля.

Наконец, в результате данного исследования четко доказано, что нейротрофическое действие стрептокиназы может быть значительно усилено одновременным использованием ионов меди или цинка (без этих ионов нервная система не может эффективно функционировать) в минимальных концентрациях. В данном плане необходимо проведение дальнейших исследований, поскольку такое суждение логически сопряжено с созданием в перспективе комплексных стрептокиназо-микроэлементных препаратов (при поддержке БРФФИ, грант Б09–215).

Список литературы

1. Никандров В.Н., Жук О.Н. Влияние стрептокиназы на развитие клеток коры головного мозга крыс *in vitro* // Морфология. – 2005. – Т. 128, № 5. – С. 33–36.
2. Никандров В.Н., Жук О.Н., Гронская Р.И., Полукошко Е.Ф., Пыжова Н.С., Петрусенко Г.П., Романовская А.А. Проблемы биотехнологии клеток нервной ткани: исследования белковых факторов трофического характера // In: “Materials, methods and technology. Scientific articles 2007”. Sci. Invest. LTD-branch Bourgas. Bulgaria. – 2007. – P. 48-66.
3. Никандров В.Н., Жук О.Н., Гронская Р.И., Полукошко Е.Ф., Романовская А.А. Действие плазминогена и стрептокиназы на жизнедеятельность клеток нервной ткани в культуре // Биомед. химия, 2008, т. 54, № 2, с. 192–200.
4. Никандров В.Н., Жук О.Н. Нейротрофические и нейропротекторные свойства и стрептокиназы и плазминогена // В кн.: «Высокие технологии, фундаментальные и

прикладные исследования в физиологии и медицине. Сб. трудов первой международной научно-практической конференции. Том. 1.» СПб, 2010, с. 181–184.

5. Никандров В.Н., Жук О.Н. Стрептокиназа и плазминоген в биотехнологии клеток нервной ткани // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2011, т. 6, № 1, с. 36–48.

6. Балашевич Т.В., Никандров В.Н. Особенности состояния клеток глиомы С6 в культуре при совместном воздействии плазминогена и глицина // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2010. № 3, с. 38–41.

7. Боголепов Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга. М. – 1976.

MANIFESTATION OF STREPTOKINASE NEUROTROPHIC EFFECT IN THE PRESENCE of Cu^{2+} or Zn^{2+} IONS

O.N. Zhuk, E.F. Polukoshko, V.N. Nikandrov

Institute of Physiology of the NAS of Belarus, Minsk, 220072 Belarus

The effect of streptokinase (20 or 2000 IE/ml, SK) additions on the structure and functional characteristics of neocortex organotypical cell cultures in the presence of CuSO_4 (10^{-7} – 10^{-5} M) or $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ (10^{-8} – 10^{-6} M) was studied.

SK partially prevented the damaging effect of Cu^{2+} or Zn^{2+} ions at their maximal cytotoxic concentrations. But at minimal concentrations, the ions increased the neurotrophic properties of SK.