

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ  
БЕЛОРУССКОЕ ОБЩЕСТВО ФИЗИОЛОГОВ



**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ  
ОРГАНИЗМА  
В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ**

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ**

*Под общей редакцией  
доктора медицинских наук, профессора В. С. Улащика  
и доктора биологических наук А. Г. Чумака*

МИНСК  
РИВШ  
2008

УДК 612.8.04:612.015 (082)

ББК 28.707.3

Ф94

Рекомендовано :  
Ученым советом Института физиологии  
Национальной академии наук Беларуси  
(протокол № 7 от 04.09.2008 г.)

Редакционная коллегия :

д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси (гл. ред.) *В. С. Улащик*;  
д-р биол. наук, проф. (ред. разд.) *В. Н. Калюнов*;  
д-р мед. наук, профессор, чл.-кор. НАН Беларуси (ред. разд.) *В. А. Кульчицкий*;  
д-р биол. наук, проф. (ред. разд.) *В. Н. Никаноров*;  
д-р биол. наук (ред. разд.) *А. Г. Чумак*;  
д-р биол. наук, проф. *Л. И. Арчакова*;  
д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси *Ф. И. Висмонт*;  
д-р биол. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси *В. В. Солтанов*;  
д-р мед. наук, проф. *А. И. Кубарко*;  
канд. биол. наук (отв. секр.) *В. С. Левковец*;  
канд. биол. наук, доц. *А. В. Сидоров*

Рецензенты :

д-р мед. наук, проф., акад. НАН Беларуси *И. П. Антонов*;  
д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси *Л. М. Лобанок*;  
д-р биол. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси *Е. И. Слобожанина*

*Книга издана при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований*

**Функциональные системы организма в норме и при патологии :**  
Ф94 сб. науч. тр. / под ред. В. С. Улащика, А. Г. Чумака. – Минск : РИВШ,  
2008. – 454 с.

ISBN 978-985-500-226-1.

Настоящее издание посвящено памяти академика Валерия Николаевича Гурина. Содержит оригинальные и важные материалы по проблемам регуляции функций, полученные физиологами и клиницистами Беларуси, России, Украины и дальнего зарубежья.

Рассчитано на широкий круг медиков и биологов, интересующихся вопросами организации и регуляции процессов жизнедеятельности.

УДК 612.8.04:612.015 (082)

ББК 28.707.3

ISBN 978-985-500-226-1

© Институт физиологии НАН Беларуси, 2008

© Оформление. ГУО «Республиканский институт  
высшей школы», 2008

# ИЗМЕНЕНИЯ ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ФЕОХРОМОЦИТОМЫ РС12 ПОД ДЕЙСТВИЕМ СТРЕПТОКИНАЗЫ

*Р. И. Гронская, В. Н. Никандров*

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

В физиологии и патологии клеток важную роль играет перичеселлюлярный протеолиз, включающий несколько протеолитических систем. В последние десятилетия большое внимание уделяют компонентам системы «плазминоген-плазмин» (в т. ч. белкам активаторам и ингибиторам этой системы).

Применительно к клеткам нервной ткани роль указанной системы продемонстрирована для целого ряда процессов: миграции шванновских клеток, роста нейритов, дифференцировки нейробластов и т. д. Вместе с тем выявлено существенное значение компонентов системы при инициации и(или) генезисе злокачественных опухолей, болезни Альцгеймера и некоторых других патологических процессов в нервной ткани. Реализация функции звена «плазминоген-плазмин» немыслима без участия активаторов плазминогена. Среди них одним из наиболее мощных является стрептокиназа (СК) – белок, продуцируемый  $\beta$ -гемолитическими стрептококками некоторых серологических групп.

В последнее десятилетие были впервые продемонстрированы прямые, непосредственные плазминогеном плазмы крови биологические эффекты СК на структурно-функциональные характеристики клеток нервной ткани в культуре коры головного мозга, вегетативных и чувствительных ганглиев: способность СК повышать жизнеспособность клеток РС12, коры головного мозга новорожденных крыс, глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 при культивировании на бессывороточных питательных средах, улучшать рост и развитие клеток ткани симпатических и чувствительных спинальных ганглиев новорожденных крыс [1; 2].

Было установлено, что воздействие SK на клетки феохромоцитомы PC12 уже через 20 мин вызывает значительные изменения уровня процессов внутриклеточного протеолиза [3]. Однако в целом влияние SK на метаболизм клеток, в т. ч. нервной ткани систематически не изучалось.

В настоящей работе предпринята попытка исследовать уровень энзиматической активности клеток феохромоцитомы PC12, находящихся в разном состоянии – нативных и трансформированных фактором роста нервов в нейроноподобные. Указанная клеточная линия удобный и часто используемый объект при исследовании механизмов нейронального роста, созревания, пролиферации и фенотипической дифференцировки.

**Материалы и методы.** Культуры клеток PC12 поддерживали регулярным пассированием на среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки крови, в стандартных условиях, их выращивали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха) при 37 °С.

За сутки до эксперимента для исключения примеси ростовых факторов и синхронизации клеток в прохождении митотического цикла ростовую среду заменяли на свежую, содержащую 0,5% сыворотки, затем со свежей ростовой средой вносили SK («Стрептаза», ОАО «Белмедпрепараты») в концентрации 10<sup>-6</sup> М или пируваткиназы скелетной мышцы кролика («Reanal», Венгрия) в концентрации 10<sup>-6</sup> М. В контрольные пробы SK или пируваткиназу не добавляли.

В отдельной серии клетки PC12 индуцировали к дифференцировке фактором роста нервов в концентрации 100 нг/мл (экспозиция 7 суток), эти клетки обрабатывали SK в концентрациях 0,1 и 1000 МЕ/мл (5·10<sup>-10</sup> и 5·10<sup>-6</sup> М) в течение 24 ч.

Активность сукцинатдегидрогеназы исследовали гистохимически тетразолиевым методом [4], количественно ее (усл. ед.) учитывали на микроскопе-фотометре MPV-2 (Leitz, Германия) по программе Cellan. Активность  $\alpha$ -аланинаминотрансферазы определяли спектрофотометрически, используя оптический тест Варбурга, по изменению абсорбции при 340 нм [5]. Количество клеток в пробе соответствовало 1 млн.

**Результаты и обсуждение.** Экспозиция клеток феохромоцитомы с SK существенного влияния на активность сукцинатдегидрогеназы не оказала (рис.).

Следует отметить, что ранее нами было показано отсутствие эффекта и суточного воздействия плазминогена ( $10^{-11}$ – $10^{-6}$  М) в среде, содержащей 0,5 % сыворотки, на активность лактат-, сукцинат- и NADH-дегидрогеназ [6]. Кроме того, как установлено предшествующими исследованиями воздействие SK в течение 20 мин на указанные клетки не вело к их гибели или изменениям морфологии при прижизненной световой микроскопии [3]. Принципиально аналогичная картина наблюдалась уже в настоящих исследованиях и через 24 ч.

Вместе с тем, добавка пируваткиназы в питательную среду приводила к заметному снижению активности внутриклеточной дегидрогеназы.

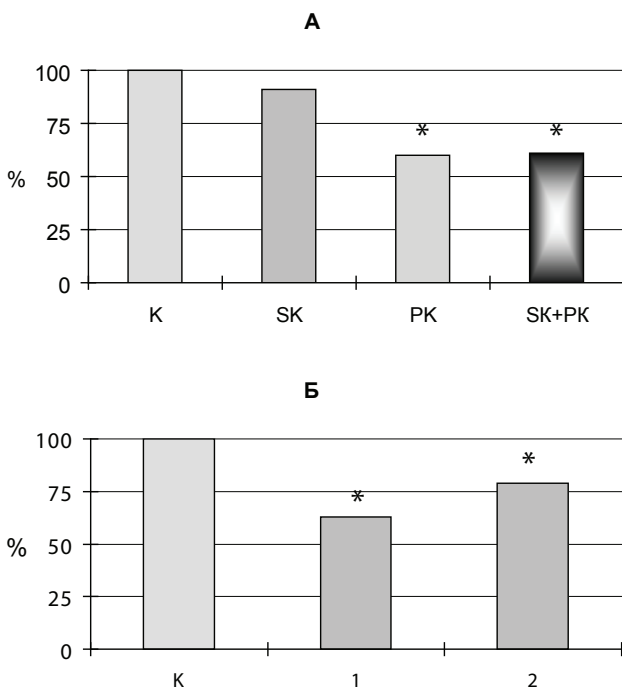


Рис. Изменения активности сукцинатдегидрогеназы в клетках феохромоцитомы PC12 (А) после воздействия SK, пируваткиназы (PK) или эквимольного комплекса этих белков (SK+PK) или активности аланинаминотрансферазы в трансформированных фактором роста нервов клетках PC12 (7 сут культура) (Б) после воздействия SK в концентрации  $5 \cdot 10^{-10}$  (1) или  $5 \cdot 10^{-6}$  М (2);\* –  $P \leq 0,0\%$

Действие эквимольного комплекса этих белков было практически аналогично эффекту пируваткиназы. Следует отметить, что избранная для экспериментов пируваткиназа представляет собой М1-тип, являющийся основным изоэнзимом мозга и единственным в скелетных мышцах. Несмотря на снижение активности сукцинатдегидрогеназы, гибели клеток в культуре не наблюдалось.

Между тем, на культурах клеток глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 установлено, что SK в концентрациях  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  М оказывала явный митогенный эффект на обе культуры, а также вызывала рост содержания внутриклеточных ДНК, РНК и белка на 20–110%. Внесение пируваткиназы через 1 сут не влияло на пролиферацию клеток глиомы С6 и уровень биополимеров, тогда как комплекс SK–пируваткиназа вызвал усиление пролиферации и рост уровня биополимеров на 30–140%. В клетках же нейробластомы IMR-32 под действием пируваткиназы нарастал уровень РНК, ДНК и белка на 25–80%. Комплекс SK–пируваткиназа обусловил рост содержания РНК и белка в этих клетках IMR-32 на 25–50%, не влияя на уровень ДНК и пролиферацию [7]. Следовательно, действие исследуемых белков на разные типы опухолевых клеток, даже и доброкачественных, к которым относится и феохромоцитома PC12 существенно различается.

Что касается трансформированных (нейроноподобных) клеток PC12, то воздействие SK даже в минимальной концентрации обусловило заметное снижение активности аланинаминотрансферазы (рис). Между тем, гибели этих клеток также не наблюдали. В целом, процессы трансминирования имеют важное значение для нервной ткани не только в энергетическом плане, но и специфического характера. Однако снижение интенсивности образования глутамата в ходе аланинаминотрансферозной реакции может быть отражением именно адаптивных перестроек метаболизма. Гораздо важнее тот факт, что воздействие стрептокиназы на нейроноподобные клетки даже в концентрации порядка  $10^{-10}$  М способно вызывать достаточно заметные изменения внутриклеточного метаболизма. Это обстоятельство заслуживает внимания по той причине, что препараты стрептокиназы разрешены в парентеральному применению в лечебных целях, однако сфера применения их ограничивается пока, в основном, использованием мощного тромболитического действия.

Итак, изложенные результаты небольшого объема исследований четко показывают необходимость дальнейшей углубленной и всесторонней разработки аспектов и механизмов цитофизиологического и метаболического действия стрептокиназы, а также продолжение дальнейших исследований биологического действия М1 формы пируваткиназы, начало которым было положено именно в нашей лаборатории в предшествующие годы.

### **Список литературы**

1. *Никандров В. Н.* [и др.] // Биомед. химия. – 2008. – Т. 54, № 2. – С. 192–200.
2. *Никандров В. Н.* [и др.] // Materials, methods and technology. Scientific articles 2007. Sci. Invest. LTD-branch Bourgas. – Bulgaria, 2007. – P. 48–66.
3. *Никандров В. Н., Петрусенко Г. П., Гронская Р. И.* // Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук. – 2003. – № 4. – С. 84–87.
4. *Лойда, З.* Гистохимия ферментов / З. Лойда, Р. Госспрау, Т. Шиблер. – М., 1982.
5. Методы клинических лабораторных исследований / В. С. Камышников [и др.]. – Минск, 2002. – С. 501–502.
6. *Никандров В. Н.* [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2008. – № 1. – С. 85–97.
7. *Романовская, А. А.* Изменения функционально-метаболического состояния клеток нервной ткани под воздействием плазминогена, стрептокиназы и их эквимольных комплексов с пируваткиназой: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А. А. Романовская. – Минск, 2007.