

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК 2010 № 3

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК 2010 № 3

ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 2004 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

ЗМЕСТ

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Конопля Е. Ф., Сушко С. Н., Маленченко А. Ф., Савин А. О., Кадукова Е. М. Оценка спонтанного и химически индуцированного мутагенеза и опухолеобразования у мышей линии Af в условиях повышенного радиационного фона	5
Титов Л. П., Столярова Е. А., Столярова Т. А. Компьютерная иммунология: сравнительный анализ замечен нуклеотидных последовательностей CDR и FR фрагментов VH генов иммуноглобулинов больных гепатитом С, криоглобулинемией и лимфомами	10
Белецкий А. В., Сошникова Е. В., Тесаков Д. К., Ильясевич И. А. Электрофизиологический контроль состояния функций спинного мозга в процессе хирургической коррекции сколиотической деформации позвоночника	19
Зафранская М. М., Федулов А. С., Нижегородова Д. Б., Мотузова Я. М., Колобова М. Ю., Багатка С. С., Миланович Н. Ф., Иванчик Г. И. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на пролиферацию Т-клеток памяти у пациентов с рассеянным склерозом	24
Эйсмонт О. Л., Пашкевич Л. А., Малюк Б. В., Голутвина Н. О., Борисов А. В., Букач Д. В. Влияние перфорации остеохондральной пластинки на регенерацию поврежденного суставного хряща в эксперименте	32
Балашевич Т. В., Никандров В. Н. Особенности состояния клеток глиомы С6 в культуре при совместном воздействии плазминогена и глицина	38
Серета В. В., Одинцов С. Г., Власов А. П., Фима Д. В., Шубенок Д. В., Кравчук З. И., Кожух Г. В., Шманай В. В., Деев С. М., Марцев С. П. Получение модифицированного полиэтиленгликолем иммунотоксина scFv4D5-барназа, специфичного к онкогену c-ErbB2, и сравнительное исследование его структурно-функциональных параметров	42
Новак Н. В. Состояние границы «зуб – пломба» при использовании различных реставрационных материалов	48

Новаковская С. А., Козловская Е. В., Рыжковская Е. Л., Манеева О. А., Арчакова Л. И. Ультраструктурные изменения в миокарде при дилатационной кардиомиопатии	52
Чернов А. Н. Морфофункциональное состояние клеток глиомы С6 в культуре при действии рекомбинантного фактора роста нервов	59
Митюкова Т. А., Леонова Т. А., Тузова А. А., Платонова Т. Ю., Луцник М. Л., Кулаковская Л. Г., Дрозд В. М. Биохимические показатели крови у пациентов с карциномой щитовидной железы после тотальной тиреоидэктомии	63
Новикова И. А., Ярец Ю. И. Взаимосвязь степени окисленности плазмы и эритроцитов в условиях активации свободнорадикального окисления	70
Девина Е. А., Принькова Т. Ю., Таганович А. Д. Особенности изменения функциональной активности альвеолярных макрофагов при контакте с сигаретным дымом	75
Бочарова В. Н., Савчина Е. Н. Гистохимический анализ активности NADPH-диафоразы, ацетилхолинэстеразы и ферментов энергетического обмена в структурах продолговатого мозга крысы при лихорадке	81
Тропникова Г. К. Сравнительный анализ протекторных эффектов интервальной гипоксии и мелатонина на серотонинергические структуры передних отделов мозга крысы	86
Терпинская Т. И. Влияние трансплантации клеток костного мозга и селезенки на прививаемость и скорость роста асцитной карциномы Эрлиха у мышей	91
Козлова Н. М., Касько Л. П., Кутько А. Г., Петрович В. А., Сержан Т. А., Слобожанина Е. И. Активность ферментов антиоксидантной защиты и окисление мембранных белков эритроцитов при некоторых патологиях беременности	97

АГЛЯДЫ

Сидоренко Г. И., Герцен М. А. Актуальные аспекты изучения прегипертонии (риск, распространенность, лечебно-профилактические вмешательства)	103
Евстигнеев В. В., Головкин В. А., Мاستькин А. С., Анапель Е. Н., Кистень О. В., Лаврентьева С. В. Нейросетевое моделирование и теория хаоса: возможности построения прогнозно-диагностических медицинских систем	109

ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ

Георгий Иванович Сидоренко (К 85-летию со дня рождения)	119
Франтишек Иванович Висмонт (К 60-летию со дня рождения)	121

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ 2010 № 3

Серия медицинских наук

на русском, белорусском и английском языках

Редактор В. Г. Каласоўская
Компьютерная вёрстка Ю. В. Дзянішчык

Здадзена ў набор 19.07.2010. Падпісана ў друк 18.08.2010. Выхад у свет 25.08.2010. Фармац 60×84¹/₈. Папера афсетная. Ум. друк. арк. 14,88. Ул.-выд. арк. 16,4. Тыраж 65 экз. Заказ 366.

Кошт нумару: індывідуальная падпіска – 17 780 руб., ведамасная падпіска – 44 110 руб.

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства «Выдавецкі дом «Беларуская навука». ЛІ № 02330/0494405 ад 27.03.2009. Вул. Ф. Скарыны, 40, 220141, г. Мінск. Пасведчанне аб рэгістрацыі № 393 ад 18.05.2009.

Надрукавана ў РУП «Выдавецкі дом «Беларуская навука».

© Выдавецкі дом «Беларуская навука»
Весці НАН Беларусі, серыя медыцынскіх навук, 2010

УДК 612.014.3:616-006.48:57.085.23+577.152.34:577.112.382.2

Т. В. БАЛАШЕВИЧ, В. Н. НИКАНДРОВ

ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК ГЛИОМЫ С6 В КУЛЬТУРЕ ПРИ СОВМЕСТНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЛАЗМИНОГЕНА И ГЛИЦИНА

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

(Поступила в редакцию 17.05.2010)

Введение. Исследования последних 20 лет доказали, что плазминоген (Pg) является нейротрофическим фактором, регулирующим ряд витальных функций клеток нервной ткани в центральной и периферической нервной системе [3–5, 9]. Установлено также, что этот белок синтезируется непосредственно в структурах нервной системы микроглией [9] и отдельными субпопуляциями нейронов [12]. Однако особенности регуляторного действия Pg раскрыты далеко не полностью, учитывая гетерогенность клеток нервной ткани не только в морфологическом, функциональном, но и в метаболическом плане.

Ранее нами было показано, что добавление Pg к культуре глиомы С6 на бессывороточной среде через 24 ч обеспечивает сохранение жизнеспособности клеток, их пролиферацию, способствует увеличению содержания РНК и белка в клетках, а через 72 ч – и повышению уровня ДНК [3–4, 6–7].

При изменении состояния клеток эффекты Pg имели существенные отличия. Так, в исходных энтерохромаффинных клетках феохромоцитомы РС12 после добавления зимогена в концентрации 10^{-9} М активность лактат- и NADH-дегидрогеназ практически не изменялась, тогда как при таком же воздействии на эти клетки, подвергнутые влиянию фактора роста нервов (при этом они трансформировались в нейрноподобные и приобретали ацетилхолинэстеразную активность), активность этих дегидрогеназ увеличивалась на 37 и 33% соответственно [5].

Судя по источникам мировой литературы, более обстоятельных исследований подобного плана ранее не проводилось.

Цель настоящей работы – раскрыть особенности совместного эффекта плазминогена и глицина на морфофункциональное состояние клеток глиомы С6 и содержание в них биополимеров.

Известно, что функция глицина в нервной ткани двояка. Эта аминокислота используется в качестве интермедиата для синтеза практически всех белков (включая нейроспецифические), нуклеозидов, ряда пептидов и других соединений. Кроме того, глицин выполняет функцию тормозного нейромедиатора.

Материалы и методы исследования. Культура крысиной глиомы С6 получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Культивирование клеток глиомы проводили по отработанной методике [1] в синтетической питательной среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 25 мкг/мл гентамицина. Для исследования использовали питательную среду, содержащую 0,5% сыворотки, чтобы исключить влияние ростовых факторов и питательных веществ, содержащихся в сыворотке. Через 3 сут в среду вносили Pg в концентрации 10^{-7} М и глицин (Applichem, Германия) в концентрациях 0,01; 0,1; 1,0; 10,0; 25,0; 50,0 мМ. Очищенные образцы Pg получены из фракции β -глобулинов белков плазмы крови методом аффинной хроматографии на лизин-сефарозе (Sigma, США); подробно суть метода, характеристика чистоты и активности образцов приведены в работе [11].

По истечении 72 ч клетки глиомы С6 отделяли от кондиционированной среды путем центрифугирования в течение 5 мин при 2000 об/мин. Содержание РНК, ДНК и белка оценивали с помощью двухволновой спектрофотометрии по О. Warburg (1942 г.), описанной Ю. Б. Филипповичем [8].

Определение содержания нуклеиновых кислот проводили в два этапа: путем щелочного и кислотного гидролиза [7]. Для обсчета результатов использовали приложение **RNA/DNA к программному обеспечению Cary WinUV** (2003 г.). Количество общего белка измеряли по абсорбции при 280 нм (с поправкой на 260 и 320 нм) на 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,5 (**Sigma**). **Содержание нуклеиновых кислот и белка** выражали в мкг/мл. Статистическую значимость полученных результатов оценивали при помощи теста непараметрического анализа (критерий Манна–Уитни) в программе Statistica 6.0. Результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение.

Прижизненную микроскопию клеток проводили в фазовом контрасте с помощью микроскопа **Opton**, Германия ($\times 16$).

Результаты и их обсуждение. Прежде всего следует отметить, что в наших экспериментах культура глиомы С6 заметно отличалась от использованной ранее [3–7]. Клетки культивировали на дефицитной по белкам сыворотки крови питательной среде не 24, а 72 ч. В этих условиях их пролиферативная активность снижалась. Заметно изменялась морфология: вместо ранее используемых в культурах веретенообразных, с небольшой сомой и 2–3 вытянутыми отростками клеток образовывались полигональные клетки с плоскими псевдоподиями и распластанной сомой крупных размеров. Принято считать, что отдельные типы клеток таких культур продуцируют GFAP (глиальный кислый фибриллярный белок) – главный маркер астроцитов [10], а культивирование клеток культуры С6 в дефицитной по белкам сыворотки крови среде способствует их дифференцировке преимущественно в астроцитоподобные [13]. В используемых в настоящей работе культурах глиомы С6 доля таких клеток составляла 50%.

При добавлении Pg в концентрации 10^{-7} М к таким клеткам доля погибших клеток снижалась лишь на 8% в сравнении с контролем. Это принципиально отличалось от действия зимогена на «незрелые» клетки глиомы С6 – доля погибших клеток снижалась практически в 6 раз [5]. Воздействие глицина в концентрации 0,01–50,0 мМ также не приводило к существенному снижению доли погибших клеток. При воздействии каждого из факторов в культуре наблюдались доминирование глиальных клеток округлой формы, потеря адгезивной способности, что выражалось в формировании конгломератов (рис. 1). Это позволяет предположить, что метаболические резервы клеток направле-

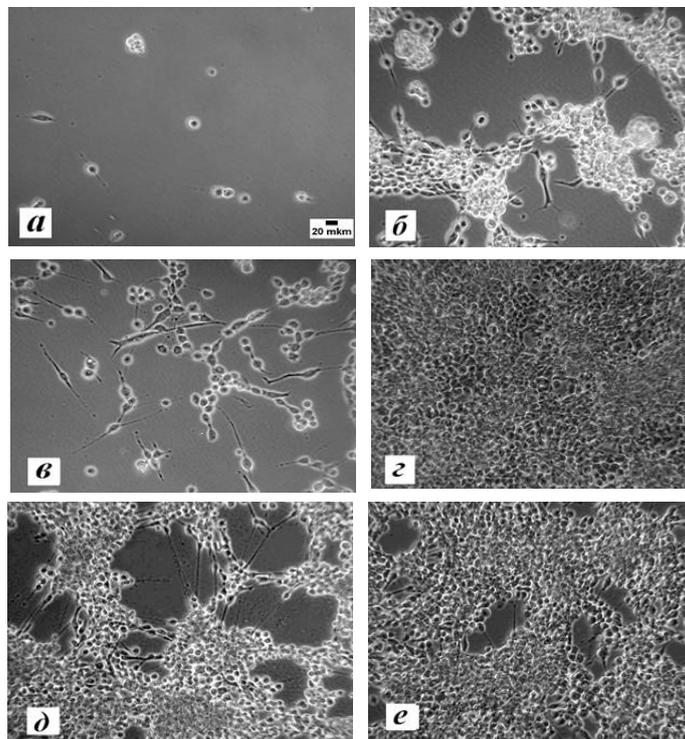


Рис. 1. Фазово-контрастная микроскопия клеток культуры глиомы С6 через 72 ч после добавления плазминогена и глицина: *a* – контроль (0,5% сыворотки в питательной среде); *б* – 10 мкг/мл плазминогена; *в* – 0,01 мМ глицина; *г* – 0,01 мМ глицина + 10 мкг/мл плазминогена; *д* – 0,1 мМ глицина; *е* – 0,1 мМ глицина + 10 мкг/мл плазминогена ($\times 16$)

ны скорее на обеспечение выживаемости в неблагоприятных условиях (общее время роста на дефицитной по белкам сыворотки крови среде – 6 сут!), чем на пролиферацию и дифференцировку.

Если же к клеткам культуры, выращенной на питательной среде, одновременно добавляли P_g и глицин (0,01 или 0,1 мМ), то доля погибших клеток не превышала 4% при четком проявлении пролиферации. Из этого следует, что P_g способен усиливать действие глицина в метаболических процессах клеток глиомы С6.

В использованных нами культурах глиомы С6 («дифференцирующихся») добавление зимогена не вызывало существенных изменений уровней общего белка и нуклеиновых кислот в клетках (рис. 2), в то же время в «незрелых» клетках их уровень возрастал в 2,3–4 раза [5].

Воздействие глицина в диапазоне концентраций от 0,01 до 25,0 мМ обусловило повышение уровня общего белка на 37–69% (рис. 2). Принято считать, что для реализации процесса биосинтеза белка необходимо присутствие одновременно всех 20 аминокислот [2]. Дополнительное введение в питательную среду лишь одной из них, видимо, не должно вызывать интенсификации биосинтеза. Можно предположить два пути реализации наблюдаемых изменений: либо добавление глицина вызывает усиление действия других аминокислот, присутствующих в базовой питательной среде, либо оно сопровождается подавлением реакций внутриклеточного протеолиза. Действительно, ранее было показано, что добавление этой аминокислоты к данной культуре сопровождается угнетением на 17–41% 2-кальпаиновой активности [1]. Отмечаемое же нами отсутствие существенных изменений уровней РНК или ДНК позволяет предположить, что наиболее вероятным является именно второй вариант.

Совместное действие зимогена и аминокислоты (в концентрациях 0,01; 0,1; 10,0 и 50,0 мМ) сопровождалось снижением уровня внутриклеточного белка на 14–19% по сравнению с контролем, тогда как после добавления P_g совместно с глицином (в концентрациях 0,01; 0,1; 1,0 и 25,0 мМ) наблюдалось повышение уровня РНК на 38–78%. Комбинированное влияние P_g и глицина (в концентрациях 0,01 и 0,1 мМ) вызывало также повышение уровня ДНК в клетках – на 38–46%.

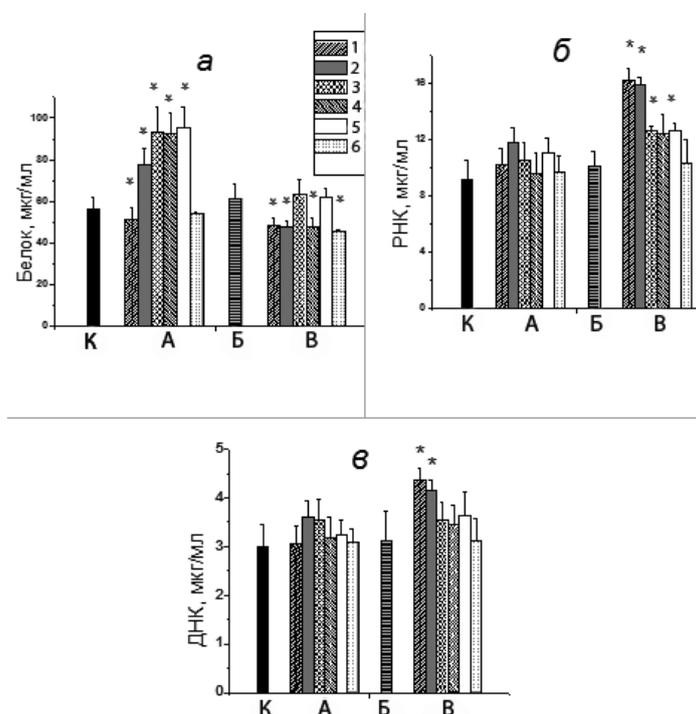


Рис. 2. Изменение содержания общего белка (а), РНК (б) и ДНК (в) в клетках глиомы С6 через 72 ч после добавления в культуру плазминогена и глицина: контроль (К); добавление глицина (А), плазминогена (Б) и плазминогена + глицина (В). Концентрация глицина, мМ: 1 – 0,01; 2 – 0,1; 3 – 1,0; 4 – 10,0; 5 – 25,0; 6 – 50,0. * – различия достоверны по отношению к контролю при $P \leq 0,05$ ($n = 5$)

Заключение. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что так называемые «дифференцирующиеся» культуры глиомы C6 в сравнении с культурами «незрелых» клеток отличаются довольно слабым изменением уровней белка и нуклеиновых кислот в ответ на воздействие Pg. Это еще раз подтверждает факт зависимости эффекта плазминогена (как и других субстанций) от состояния клеток нервной ткани.

Кроме того, представленные результаты позволили заключить, что эффект Pg существенно изменяется в присутствии глицина, принципиально отличаясь от эффекта каждого из исследуемых соединений. Причем в зависимости от концентрации изменения носили сложный характер: ни в одном случае сдвиги не имели противоположной направленности, но проявлялись при действии не всех концентраций аминокислоты. Это диктует необходимость проведения дальнейших исследований в данном направлении в целях выяснения механизмов выявленных сдвигов, а также для расширения арсенала метаболических эффекторов нейротрофического действия плазминогена.

Литература

1. Балашевич Т. В., Никандров В. Н., Гронская Р. И., Тумилович М. К. // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. 2009. № 2. С. 61–63.
2. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия. М., 2002.
3. Никандров В. Н., Жук О. Н., Гронская Р. И. и др. // Materials, methods and technology. Scientific articles. 2007. P. 48–66.
4. Никандров В. Н., Жук О. Н., Гронская Р. И. и др. // Биомед. химия. 2008. Т. 54, № 2. С. 192–200.
5. Никандров В. Н., Жук О. Н., Пыжова Н. С. и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2008. № 1. С. 85–97.
6. Романовская А. А., Жук О. Н., Никандров В. Н. // Наука и инновации. 2007. № 3. С. 24–27.
7. Романовская А. А. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2005. № 5. С. 38–41.
8. Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии. М., 1975. С. 182–184.
9. Kohsaka S., Nakajima K., Hamanoue M. et al. // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 1994. Vol. 20, N 2. P. 190.
10. Nagamatsu S., Nakamichi Y., Inoue M. et al. // Biochem. J. 1996. N 319. P. 477–482.
11. Nikandrov V. N., Murashko O. N., Vorobyova G. V. et al. // Lett. Pept. Sci. 1997. Vol. 4. P. 497–502.
12. Tsirka S. E., Rogove A. D., Bugge T. H. et al. // J. Neurosci. 1997. Vol. 17, N 2. P. 543–552.
13. Weiwei Hu, Onuma T., Birukawa N. et al. // Cell. Mol. Neurobiol. 2008. Vol. 28. P. 519–528.

T. V. BALASHEVICH, V. N. NIKANDROV

PECULIARITIES OF C6 GLIOMA CELLS STATE IN CULTURE UNDER THE JOINT EFFECT OF PLASMINOGEN AND GLYCINE

Institute of Physiology of NAS of Belarus, Minsk

Summary

The plasminogen influence on cellular DNA, RNA, whole protein level and morpho-functional state of the so-called “differentiated” C6 glioma culture cells (6 days exposition in the medium with the deficiency of serum proteins) against underground of glycine additions has been investigated. The “differentiated” C6 glioma cells are characterized by quite weak changes of the protein and nucleic acids level in response to plasminogen addition as against “immature” cells. In the presence of glycine, the zymogene effect was modified essentially – observed picture fundamentally differed from the effects of each of the investigated compounds. The joint effect of plasminogen (10^{-7} M) and glycine (0.01 or 0.1 mM) during 72 h led to nucleic acids and whole protein level increasing and 96%-tage vital activity of C6 glioma cells in the medium with serum deprivation.