

**ДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА КЛЕТКИ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ: ИЗМЕНЕНИЯ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК НЕРВНОЙ ТКАНИ
В ПРИСУТСТВИИ СТРЕПТОКИНАЗЫ**

Никандров В.Н., Романовская А.А., Полукошко Е.Ф., Институт физиологии НАН Беларуси

Несмотря на принимаемые меры по профилактике заболеваний инфекционной этиологии у домашних животных и птиц и их оздоровлению, проблема далека от решения. Например, приобретенные иммунодефициты у птиц вызываются разнообразной, в том числе и условно-патогенной микрофлорой [1]. Между тем, воздействие синтезируемых такими микроорганизмами белков на клетки и ткани макроорганизма остается практически слабо изученным. В этом плане существует два ракурса вопроса: 1. Изменение структуры и функции клеток макроорганизма под действием таких белков. 2. Использование протеинов подобного типа для направленной регуляции жизнедеятельности клеток (пролиферации, дифференциации), включая клетки нервной ткани, в целях решения задач биотехнологии, а также для коррекции нарушений жизнедеятельности клеток нервной ткани, учитывая нарастающие нейротропные воздействия биологических и химических факторов.

Одним из подобных белков является стрептокиназа – белок β -гемолитических стрептококков, не обладающих токсическими свойствами, но являющийся мощнейшим активатором плазминогена и, следовательно, системы фибринолиза.

Цель работы – выяснение действия стрептокиназы на жизнедеятельность различных типов клеток нервной ткани *in vitro*. В качестве модели воздействия нами были избраны глиоциты крысиной глиомы С6, недифференцированные клетки злокачественной опухоли нейробластомы IMR-32, а также первичные культуры чувствительных спинальных и симпатических ганглиев крысы.

Культуры клеток крысиной глиомы С6 и нейробластомы человека IMR-32 поддерживали регулярным пассированием на питательной среде DMEM (Sigma, USA), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ), спинальные и симпатические краниальные шейные ганглии новорожденной крысы культивировали по методике, описанной нами ранее [2]. Посевы инкубировали в CO_2 -инкубаторе с 5% содержанием CO_2 при температуре 37 °C. Наблюдение за перевиваемыми культурами осуществлялось через 1 сутки, когда появляются первые признаки морфо-функциональных изменений, и 3 суток, когда они достаточно хорошо выражены, а для первичных культур время наблюдения составило 1-30 суток. Анализ сопровождался визуальной оценкой общего состояния и морфогенеза объектов.

Для постановки эксперимента монослойную культуру клеток перевиваемых линий рассевали на пластиковые чашки (диаметр 35 мм) с плотностью 25 000 кл./см² для глиомы С6 и 50 000 кл./см² для нейробластомы IMR-32. Предварительно было установлено, что такая плотность для клеток наиболее оптимальна для работы с данными культурами, и при таких условиях клетки находятся в фазе постоянного роста во время проведения эксперимента. На следующие сутки клетки переводили на среду DMEM, содержащую 0,5% телячьей сыворотки с целью синхронизировать популяцию клеток в клеточном цикле и минимизировать влияние ростовых факторов и питательных веществ, содержащихся в сыворотке. Через 24 часа после этого вносили SK (ОАО "Белмедпрепараты", Беларусь), растворенную в бессывороточной среде, в концентрациях 10^{-7} , 10^{-9} и 10^{-11} М. Спинальные и симпатические ганглии культивировали в питательной среде, содержащей 10% и 0,5% телячьей сыворотки с добавлением 2×10^{-6} М SK.

Уровень макромолекул (ДНК, РНК, белка) определяли с использованием метода двухволновой спектрофотометрии по методике, описанной Ореховичем В.Н., 1977 (спектрофотометр Cary-100, Varian, USA) [3]. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в культуральной жидкости определяли спектрофотометрически, регистрируя падение концентрации NADH в ходе катализируемого ЛДГ процесса превращения пирувата в лактат [4]. Прижизненную микроскопию выполняли при помощи фазово-контрастного микроскопа (OPTRON, Германия). При измерении величины зоны роста использовали значение индекса профильного поля (ИПП). При увеличении микроскопа $10 \times 3,2$ с помощью винтового окулярметра измеряли наименьший и наибольший диаметры зоны роста культивируемых ганглиев, полученные значения перемножали и делили на 1000 [2].

Все исследования выполнены не менее, чем трехкратно. Статистическую обработку результатов проводили в программе STATISTICA 6.0. Результаты представляли как среднее \pm стандартное отклонение. Сравнение независимых выборок производили при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Развитие ганглиев в культуре существенно зависело от состава питательной среды. У ганглиев, культивируемых на среде, содержащей 10% телячьей сыворотки, вначале разрыхлялась оболочка, клетки мигрировали за пределы эксплантата, наблюдался интенсивный выход регенерирующих отростков нервных клеток. Спустя 5-7 суток, зона роста представляла собой плотную многослойную структуру, в состав которой входили активно пролиферирующие фибробласты, глиальные клетки, фагоциты и отростки нервных клеток, которые часто образовывали густую переплетающуюся сеть. Ганглий просветлялся, сквозь толщу клеток просматривались отдельные нейроны.

Культуры, инкубируемые в питательной среде с 0,5% сыворотки, значительно отставали в развитии, скорости формирования галло и плотности зоны роста. Размер зоны роста таких культур был меньше величины зоны роста культур, развивающихся в обогащенной белками сыворотки крови питательной среде в 1,2-1,5 раза через 2 суток и в 3,1-4,8 раза спустя 7 суток от начала культивирования.

SK существенно влияла на скорость формирования галло у всех изучаемых ганглиев: чувствительного спинального, а также симпатического краниального шейного ганглия. При этом изменения были однонаправлены. Так, через 5 сут культивирования в питательной среде, содержащей 10% телячьей сыворотки, зона роста спинальных ганглиев увеличилась в среднем в 1,25 раза, а краниальных шейных ганглиев – в 2,2 раза. Таким образом, наибольшее увеличение зоны роста наблюдалось для культур симпатического ганглия, что, по-видимому, связано с большей массой самого ганглия, и соответственно, большим числом клеток, выходящих из зоны роста под влиянием SK.

Влияние SK на культуры спинальных ганглиев в обогащенной белками сыворотки крови питательной среде более выражено. Зона роста культур в присутствии SK имела повышенную плотность при сравнении с контролем за счет интенсивной пролиферации и миграции из экс-

плантата клеток различной природы. Особо выделялись многочисленные шванновские клетки, расположенные вдоль радиально направленных отростков нервных клеток. Длительное наблюдение за культурами (свыше 14 сут) показало способность SK в питательной среде, содержащей 10% телячьей сыворотки, значительно улучшать рост и развитие симпатических и чувствительных спинальных ганглиев новорожденной крысы.

Культивирование трансформированных клеточных линий в бессывороточной среде приводит к остановке пролиферации клеток и их тотальной гибели уже в течение 4 суток. Так, в клетках глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 уровень ДНК, РНК и белка через 24 часа инкубации и на протяжении последующего времени культивирования оставался неизменным. Активность ЛДГ в культуральной жидкости возрастала к третьим суткам возрастала в 5,1 раза для IMR-32 и в 10 раз для глиомы С6, что свидетельствует о нарушении целостности цитоплазматической мембраны и прогрессировании дегенеративных процессов в клетках нервной ткани.

Через 24 часа после добавки SK в концентрации 10^{-7} и 10^{-9} М зарегистрировано увеличение содержания нуклеиновых кислот и белка в глиальных клетках. Причем уровень ДНК увеличивался в 2,1-1,6 раза, РНК – в 1,7-1,3 раза, белка – в 1,6-1,3 раза. К третьим суткам отличия с контролем стали еще разительнее: содержание ДНК было в 3,9-2,9 раза, РНК – в 5,9-3,8 раза и белка – в 7,8-5,6 раза выше контрольных значений, причем увеличение содержания макромолекул регистрировали при всех концентрациях SK. Активность ЛДГ в среде культивирования для клеток, инкубировавшихся в присутствии SK, была ниже контрольных показателей.

Сходные тенденции просматривались и при инкубации со SK клеток нейробластомы. Таким образом, культивирование нервных клеток из перевиваемых линий в бессывороточной среде с добавкой SK вело к увеличению содержания макромолекул в клетках и снижению активности ЛДГ в среде культивирования в сравнении с контролем, как для глиомы С6, так и для нейробластомы IMR 32, на протяжении всего времени наблюдения. Однако в большей степени SK способствовала поддержанию жизнедеятельности глиоцитов, на что указывает более высокая концентрация в них нуклеиновых кислот и белка, а также более низкая активность экстракционной ЛДГ в сравнении с нейрочитами. Кроме того, в культуре IMR-32 визуально регистрировали больше клеток с нарушением адгезивных контактов.

Таким образом, добавка SK в обогащенную сывороточными белками питательную среду для культур периферических ганглиев и диссоциированных симпатических нейронов способствует их росту, развитию и дифференцировке. А добавка SK в среду с дефицитом белков сыворотки способствует поддержанию жизнеспособности и пролиферативной активности клеток перевиваемых линий глиомы С6 и нейробластомы IMR-32.

Полученные в данной работе факты подтверждают наличие у SK регуляторных свойств. Действие SK направлено на стабилизацию функций клеток и увеличение их выживаемости в неблагоприятных условиях. Причем позитивный эффект SK более выражен в отношении глиальных клеток, нежели нейрональных. Однако, по всей видимости, данный положительный эффект SK имеет временные ограничения, так как продолжительное действие этого белка ведет к явным деструктивным изменениям клеток, которым в большей мере подвержены астроциты [5].

Важный вопрос – механизм действия SK. Поддерживающее действие SK в отношении клеток, культивировавшихся в отсутствие ЭТС, возможно объяснить наличием у SK супероксид-дисмутазоподобных свойств [6]. Гибель клеток в бессывороточной среде обусловлена, главным образом, развитием процессов оксидативного стресса, а SK способна конвертировать супероксидный радикал, что имеет особый смысл в связи с ролью активных форм кислорода в патогенезе ряда заболеваний и нейрональной гибели [7].

Полученные данные раскрывают перспективу по исследованию воздействия других белков, синтезируемых микроорганизмами, на клетки и ткани организма-хозяина, что позволит уяснить процессы, происходящие на молекулярно-клеточном уровне при заражении организма.

Литература. 1. Бирман Б.Я. Приобретенные иммунодефициты птиц, их лечение и профилактика // Автореф. дисс. докт. вет. наук. - Минск, 2003. - 33 с. 2. Роль взаимодействия звеньев протеолиза и белковых факторов роста в регуляции функциональных свойств нервной ткани (заключительный отчет по теме № 19991463, Институт физиологии НАН Беларуси. Рук. НИР В.Н.Никандров), Мн. - 2001. - 139 с. 3. Трудолюбова М.Г. // Современные методы в биохимии. Под ред. В.Н. Ореховича. М., Медицина, 1977. - С. 313-316. 4. Ещенко Н.Д. // Методы биохимических исследований. Под ред. М.И. Прохоровой. Л., 1982. - С. 222-226. 5. Никандров В.Н. и Жук О.Н. Влияние стрептокиназы на развитие клеток коры головного мозга крысы *in vitro* // Морфология. - 2005. - Т. 128, № 5. - С. 33-36. 6. Nikandrov V.N. On the plasminogen-activating function of streptokinase // *Int. J. Biochem.* - 1992. - Vol. 24, № 1. - P. 43-57. 7. Elberger A.J., Smith E.L. and White J.M. Spatial dissociation of visual inputs alters the origin of the corpus callosum // *Neurosci. Lett.* - 1983. - Vol. 35, № 1. - P. 19-24.