

07

АРУСЬ ЗАНИМАЕТСЯ
ТРАНСПОРТОМ
ИЩЕГО

| 21 ПЕРСПЕКТИВНЫЕ
ХИМИЧЕСКИЕ
ТЕХНОЛОГИИ

| 36 НАУКА,
ИННОВАЦИИ И
ЭНЕРГОБЕЗОПАСНОСТЬ

| 63 МЕЖДУНАРОДНЫЕ
СТАНДАРТЫ
В ОБЛАСТИ ОПС

НАУКА И ИННОВАЦИИ

научно-практический журнал



№ 3(49)_2007



МИССИЯ СОВРЕМЕННОГО ТРАНСПОРТА

ISSN 1818-9857
9771818985001

В НОМЕРЕ 3(49)_2007

МИССИЯ СОВРЕМЕННОГО ТРАНСПОРТА

- 7 Владимир Лебедев
ТРАНСПОРТ БУДУЩЕГО
- 18 Снежана Михайловская
В БОРЬБЕ ЗА КАЖДЫЙ ВАТТ

В МИРЕ НАУКИ

- 21 Владимир Комаров
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ
- 24 Алеся Романовская, Ольга Жук, Виталий Никандров
РОЛЬ ПЛАЗМИНОГЕНА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ
- 28 Оксана Романова, Наталья Коломиец, Ольга Алейникова
ЛЕЧЕНИЕ ГЕПАТИТА С У ДЕТЕЙ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
- 31 Наталья Антоненкова
СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПРОФИЛАКТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ИННОВАЦИИ

- 36 Жанна Комарова
НАУКА, ИННОВАЦИИ И ЭНЕРГОБЕЗОПАСНОСТЬ
- 43 КРУГЛЫЙ СТОЛ «ВЛАДЕЯ ПРЕДМЕТНОЙ ОБЛАСТЬЮ»
- 52 Елена Силкина
РАЗВИТИЕ НАЦИОНАЛЬНОЙ ИННОВАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ В США
- 56 Дмитрий Степаненко
РЕАЛИЗАЦИЯ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ИННОВАЦИОННОЙ ПОЛИТИКИ В РЕСПУБЛИКАХ СНГ

СИНЕРГИЯ ЗНАНИЙ

- 60 Сергей Дедков
МОНИТОРИНГ НАУЧНОЙ И ИННОВАЦИОННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ:
НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ МЕТОДОЛОГИИ
- 63 Диана Иванова
МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ В ОБЛАСТИ ОХРАНЫ ОПС И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БЕЛАРУСИ
- 67 Виталий Калинин
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫЙ ПРОДУКТ КАК ОБЩЕСТВЕННОЕ БЛАГО

ПАНОРАМА НОВОСТЕЙ 2

ИНФОЛИНИЯ 71

Алеся Романовская

младший научный сотрудник лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси, аспирантка

Ольга Жук

старший научный сотрудник лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси, кандидат биологических наук

Виталий Никандров

заведующий лабораторией регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор

УДК 576.535:577.15

Роль плазминогена при культивировании нервной ткани

Система плазминогена включает в себя неактивный профермент плазминоген (ПГ), который превращается в активный фермент плазмин при расщеплении одной пептидной связи. Активность плазмина регулируется активаторами ПГ, их ингибиторами и ингибиторами плазмина [1]. Помимо этого генерация плазмина очень сильно зависит от связывания ПГ с плазматической мембраной [2]. Природа сайтов связывания ПГ/плазмина на клетках разнообразна и еще не до конца идентифицирована. К настоящему моменту известно, что ПГ/плазмин способен к ассоциации с α -енолазой [3, 4], аннексином II [5], амфотерином [6], ганглиозидом GM 1 [7].

Присутствие ПГ в ряде структур головного мозга было доказано на крысах [8] и мышах [9]. В ЦНС синтез ПГ осуществляется нейронами [10] и микроглией [11]. На клеточных и организменных моделях проведены многочисленные эксперименты по исследованию роли ПГ в физиологии и патологии нервной системы. Как показано в опытах с использованием трансгенных мышей, система ПГ участвует в реализации ряда физиологических функций мозга, таких, как процессы обучения, запоминания, синаптической пластичности [12, 13, 14]. Помимо этого через ее действие реализуется эксайтотоксичность после ишемии и инсульта [15].

Тяжелые травмы мозга, ишемия/реперфузия и ряд нейродегенеративных заболеваний (болезнь Паркинсона, инсульт, амиотрофический боковой склероз) сопровождаются стимуляцией продукции клетками мозга активных форм кислорода, которые в свою очередь вызывают оксидативный стресс и гибель клетки через некроз или апоптоз [16, 17, 18, 19]. Известно, что активные формы кислорода могут модулировать действие ПГ [20]. Однако значение этого взаимодействия для физиологии и патологии нервной системы остается не до конца выясненным.

Цель настоящей работы — изучение влияния ПГ в различных концентрациях на жизнеспособность клеток глиомы C6 и нейробластомы IMR-32 при их культивировании в среде инкубации, лишенной сыворотки крови. Наряду с этим было исследовано, как влияет ПГ на ультраструктуру клеток симпатических ганглиев взрослой крысы в условиях действия на них индуктора окислительного стресса — перекиси водорода.

Материал и методика

Культуры перевиваемых клеточных линий. Опыты проводили на культурах клеточных линий глиомы C6 и нейробластомы IMR-32. Клетки выращивали в питательной среде ДМЕМ с L-глутамином (Sigma, США), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки крови (HyClone, Бельгия) и 10 мкг/мл гентамицина (полная среда инкубации) в CO₂ инкубаторе в атмосфере, содержащей 5% CO₂ при 37°C. Для полного исключения влияния сывороточного ПГ, а также белков-активаторов и ингибиторов ПГ эксперименты выполняли на среде без сыворотки (минимальная ДМЕМ).

После пересева клеток в чашки Петри (диаметром 35 мм) их выдерживали в полной среде инкубации в течение суток, затем переводили на среду, содержащую 0,5% сыворотки, чтобы синхронизировать популяцию клеток в клеточном цикле и минимизировать влияние белков и пептидов сыворотки на культуру. На третий день в опытных чашках питательную среду сменяли на минимальную (в контроле) либо с содержанием ПГ в концентрации 0,001; 0,1 и 10 мкг/мл. Очищенные образцы ПГ, полученные из фракции β -глобулинов аффинной хроматографией на лизин-сефарозе, были предоставлены старшим научным сотрудником НИИ эпи-

демиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь кандидатом биологических наук Н. С. Пыжовой. Перед внесением в среду инкубации ПГ был стерилизован путем пропускания через стерильные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

О неблагоприятных последствиях депривации сыворотки при культивировании перевиваемых клеточных линий и о защитном эффекте ПГ судили по изменению активности внеклеточной лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а также по сорбции клетками красителя трипанового синего. Культуры инкубировали в течение одних либо трех суток, в зависимости от протокола опыта, затем из проб брали аликвоты надосадочной жидкости для определения активности ЛДГ. Чтобы исключить попадание отдельных неприкрепленных клеток в надосадочную жидкость при взятии проб для определения активности фермента, клетки переносили в пробирки и центрифугировали в течение 5 мин. при 150—200 г.

Определение активности ЛДГ в среде культивирования клеток. Активность ЛДГ определяли спектрофотометрически по методу [21]. Образцы исследуемых сред (300 мкл) добавляли к свежеприготовленной субстратно-буферной смеси (0,76 мМ пирувата натрия/85 мкМ НАДН (Sigma, США) в 0,1 М К-фосфатном буфере, pH 7,5) при комнатной температуре. Об активности фермента в аликвотах надосадочной жидкости судили по изменению уровня НАДН, который измеряли по уменьшению оптической плотности при 340 нм на спектрофотометре Cary-100 (Varian, Австралия) в течение 1 мин.

Жизнеспособность клеток оценивали методом окраски трипановым синим [22]. Для этого использовали 0,4% раствор красителя, приготовленный на фосфатном буфере с pH 7,2. Число клеток подсчитывали в камере Горяева. Процентное содержание жизнеспособных клеток рассчитывали по формуле:

$$A = (B-C)/B \times 100,$$

где А — процент жизнеспособных клеток; В — число всех клеток; С — число нежизнеспособных клеток.

Все результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение не менее трех независимых измерений, выполненных в триплетах. Статистическая значимость полученных результатов была оценена при помощи U-теста для непараметрических выборок. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для установления характера связи между концентрацией ПГ в питательной среде и активностью ЛДГ в среде культивирования вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Statistica 6.0.

Органная культура краниального шейного ганглия половозрелых крыс. Ганглии извлекали из белых крыс массой 180—200 г под наркозом (нембутал внутривенно 30 мг/кг веса животного), освобождали от капсул и культивировали в течение 24 часов в чашках Петри на полной питательной среде ДМЕМ, содержащей 15% телячьей эмбриональной сыворотки в инкубаторе при 37°C и 5% содержании CO₂. Эксперименты проводили на среде ДМЕМ с 0,5% содержанием телячьей сыворотки. ПГ вносили в концентрации 10 мкг/мл, перексид водорода — 10⁻⁴ М. Было проведено 4 серии экспериментов, ганглии инкубировали в:

- минимальной среде ДМЕМ;
- ДМЕМ + ПГ;
- ДМЕМ + H₂O₂;
- ДМЕМ + ПГ + H₂O₂,

а затем фиксировали для электронно-микроскопического исследования по стандартной методике глутаровым альдегидом, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации и заливали в смесь эпон-аралдита [23]. Ультратонкие срезы исследовали на электронном микроскопе. Каждая серия экспериментов выполнялась в 4-кратной повторности.

Результаты исследования и их обсуждение

Добавка ПГ в минимальную среду культивирования защищает клетки от дегенерации. В среде культивирования постоянно регистрируется некоторый базальный уровень активности ЛДГ, что связано с механическим травмированием клеток при пересеве. Но массивный выход ЛДГ во внеклеточное пространство является количественным показателем степени клеточной дегенерации [21]. Культивирование клеток в минимальной среде неблагоприятно влияет на их выживаемость и рост. Как правило, в среде, лишенной сыворотки, они гибнут в течение 4 суток. Результаты, полученные на клеточных линиях нейробластомы IMR-32 и глиомы С6, являются однотипными и свидетельствуют о том, что добавка ПГ в среду культивирования ведет к снижению активности внеклеточной ЛДГ. Причем этот эффект обратно пропорционален концентрации исследуемого агента, то есть с увеличением концентрации ПГ уменьшается выход ЛДГ в среду культивирования. Этот защитный эффект ПГ более выражен для клеток глиомы (рис. 1). В контроле глиомы С6 к третьим суткам инкубации активность ЛДГ увеличивается в 8,7 раза по сравнению с первыми сутками. Однако при внесении ПГ в концентрации 10 мкг/мл через трое суток инкубации выход ЛДГ в культуральную жидкость не отличается от контрольных значений на первые сутки инкубации.

Активность внеклеточной ЛДГ в контроле нейробластомы IMR-32 на третьи сутки увеличивается в 5 раз по сравнению с первыми

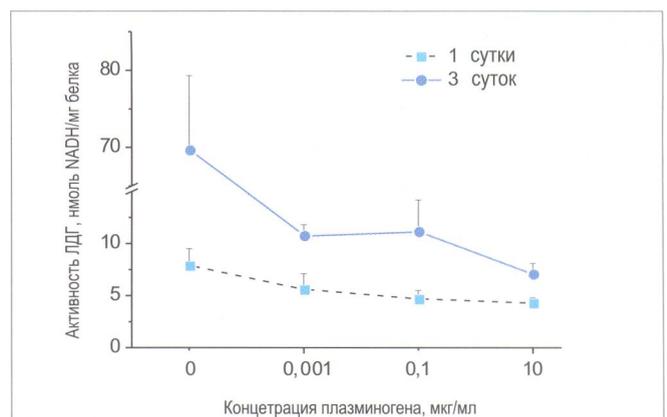


Рис. 1. Активность ЛДГ в бессывороточной среде культивирования глиомы С6 в различных концентрациях ПГ

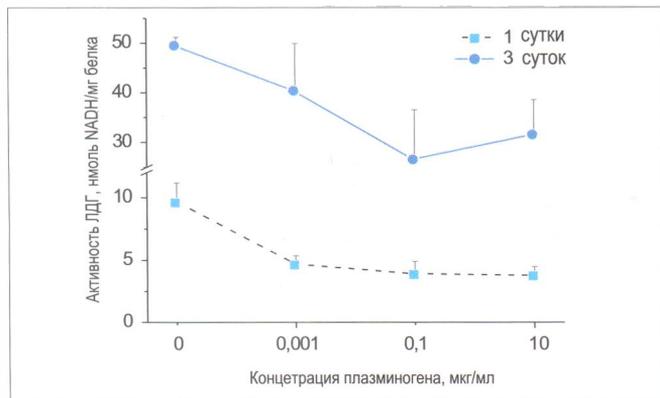


Рис. 2. Активность ЛДГ в бессывороточной среде культивирования нейробластомы IMR-32 с различными концентрациями ПГ

сутками инкубации. Тогда как в среде, в которой культивировали нейробластому с добавкой ПГ в концентрации 0,1–10 мкг/мл, на протяжении всего времени наблюдения регистрируется достоверное снижение выхода ЛДГ в сравнении с контролем (рис. 2).

При анализе связи между активностью внеклеточной ЛДГ и концентрацией ПГ было установлено, что в обоих случаях она является отрицательной и носит нелинейный характер, о чем свидетельствует статистически незначимая величина коэффициента Спирмена ($p > 0,05$).

При исследовании жизнеспособности клеток было отмечено, что в контроле она составляет 13% (для клеток глиомы С6) и 35% (для клеток нейробластомы). Добавка ПГ во всех исследуемых концентрациях в среду культивирования способствует поддержанию жизнеспособности клеток на уровне 98–99% (С6) и 60–90% (IMR-32).

Известно, что гибель клеток в отсутствие сыворотки, главным образом, объясняется усилением процессов образования активных форм кислорода [24]. Последний факт заставил нас предположить, что повышение жизнеспособности нервных клеток под действием ПГ объясняется его способностью снижать интенсивность свободнорадикальных реакций в них. Для проверки данного предполо-

жения представлялось необходимым изучение способности ПГ предотвращать гибель нервных клеток при действии на них индукторов окислительного стресса. В качестве объекта исследования для решения этой задачи была выбрана культура симпатических ганглиев взрослых крыс с нетрансформированным геном, чтобы стало возможным апплицировать результаты исследования на здоровый организм. В работе использовали концентрацию ПГ 10 мкг/мл, в которой он, как оказалось, вызывает наибольший по амплитуде ответ.

Плазминоген препятствует дегенерации нейронов и глии при моделировании окислительного стресса. Культивирование симпатических ганглиев взрослых крыс в обогащенной питательной среде не приводило к существенным изменениям их ультраструктуры (рис. 3). Мембрана ядер нервных клеток гладкая, ядерный хроматин диспергирован равномерно, ядрышки электронно плотные. В цитоплазме представлены все органеллы, включая аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум и множество полисом, митохондрии, лизосомы и др. Инкубация указанных узлов в присутствии ПГ не вызвала значительных отличий от контроля. Мембрана ядер ровная, ядерный хроматин распределен равномерно, хотя в цитоплазме отмечается некоторое функциональное напряжение нейроцитов, выражающееся в расширении крист митохондрий и появлении гранул гликогена.

Перинеурональные глиоциты выглядели гипертрофированными и отличались обилием везикул с плотным центром, так же, как и те клетки, в цитоплазму которых были заключены безмякотные нервные проводники (рис. 4). Экспозиция ганглиев в среде, содержащей пероксид водорода, приводила к развитию обширной дегенерации по некротическому типу: вакуолизации как нервных, так и глиальных клеток, их набуханию и лизису (рис. 5). При одновременном введении в питательную среду ПГ и пероксида водорода в указанной выше концентрации и культивировании симпатических ганглиев в течение 24 часов структурно-функциональная организация как нервных, так и глиальных клеток сохраняется, но присутствует некоторое их напряжение, которое выражается в расширении крист эндоплазматического ретикулума вплоть до образования вакуолей, однако разрывов мембран не наблюдалось (рис. 6). Кроме того, в цитоплазме отмечено наличие электронно-

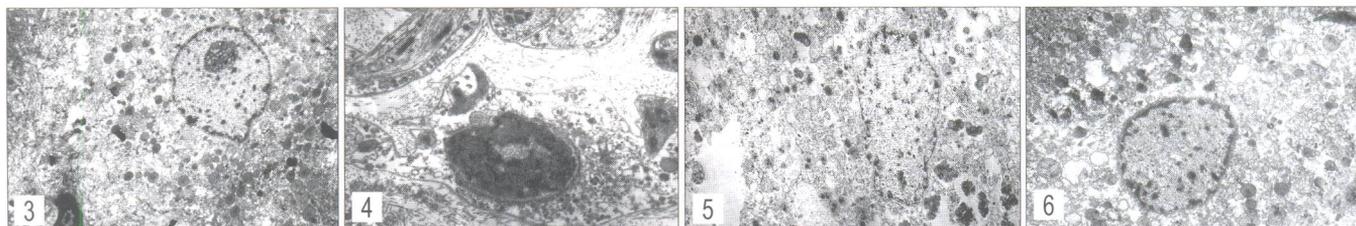


Рис. 3. Органная культура КШГ взрослой крысы. 24 часа *in vitro*. Питательная среда ДМЕМ, содержащая 15% эмбриональной телячьей сыворотки (контроль). Электронограмма участка нейроцита. Ув. 3000

Рис. 4. Органная культура КШГ взрослой крысы. 24 часа *in vitro*. Питательная среда ДМЕМ+ПГ. Глиоцит, включающий в себя нервные проводники. Ув. 8000

Рис. 5. Деструктивные изменения органной культуры КШГ взрослой крысы. 24 часа *in vitro*. ДМЕМ+H₂O₂. Ув. 5000

Рис. 6. Органная культура КШГ взрослой крысы. 24 часа *in vitro*. Питательная среда ДМЕМ+ПГ+H₂O₂. Ув. 5000

плотных включений, возможных мест хранения катехоламинов. При сравнении электронограмм экспериментов серии 3 и 4 можно констатировать, что присутствие ПГ в культуральной среде существенно уменьшает деструктивное действие пероксида водорода.

Таким образом, и количественная, и качественная оценка (посредством анализа выхода ЛДГ из клеток, оценки жизнеспособности и электронно-микроскопического исследования) дегенерации на различных клеточных моделях показывает, что внесение в среду ПГ коррелирует с уменьшением клеточной дегенерации. Механизм такого влияния пока не ясен. Известно, что ПГ способен генерировать активные формы кислорода (в том числе разлагая H_2O_2) и в то же время осуществлять их конверсию. Возможно, отчасти приведенные факты обусловлены именно последней. Можно предположить, что в данной ситуации ПГ является «ловушкой» цитотоксических радикалов. Вместе с тем взаимодействие ПГ с мембранными структурами клеток нервной системы способно вызывать их модификацию, что может изменять чувствительность к окислителям.

Литература

- Collen D. The plasminogen fibrinolytic system // *Thromb. Haemost.*, 1999, v. 82. P. 259—270.
- Plow E.F. et al. The cell biology of plasminogen system // *FASEB J.*, 1995, v. 9. P. 939—945.
- Miles L.A. et al. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of β -enolase as a candidate plasminogen receptor // *Biochem.*, 1991, v. 30. P. 9337—9343.
- Nakajima K. and Hamanoue M. Plasminogen binds specifically to β -enolase on rat neuronal plasma membrane // *J. Neurochem.*, 1994, v. 63. P. 2048—2057.
- Hajjar K.A. and Acharya S.S. Annexin II and regulation of cell surface fibrinolysis // *Ann. NY Acad. Sci.*, 2000, v. 902. P. 265—271.
- Parkkinen J. and Rauvala H. Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphoterin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphoterin // *J. Biol. Chem.*, 1991, v. 266. P. 16730—16735.
- Miles L.A. et al. Gangliosides interact directly with plasminogen and urokinase and mediate binding of these fibrinolytic components to cells // *Biochem.*, 1989, v. 28. P. 9337—9343.
- Davies B.J. et al. Serine Proteases in Rodent Hippocampus // *J. Biol. Chem.*, 1998, v. 273, № 36. P. 23004—23011.
- Basham M.E. and Seeds N.W. Plasminogen expression in the neonatal and adult mouse brain // *J. Neurochem.*, 2001, v. 77, № 1. P. 318—325.
- Tsirka S.E. et al. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus // *J. Neurosci.*, 1997, v. 17, № 2. P. 543—552.
- Nakajima K. et al. Microglia-derived elastase produces a low-molecular-weight plasminogen that enhances neurite outgrowth in rat neocortical explant cultures // *J. Neurochem.*, 1993, v. 61, № 6. P. 2155—2163.
- Calabresi P. et al. Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory // *Eur. J. Neurosci.*, 2000, v. 12. P. 1002—1012.
- Qian Z. et al. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation // *Nature*, 1993, v. 361, № 6411. P. 453—457.
- Madani R. et al. Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice // *EMBO J.*, 1999, v. 18. P. 3007—3012.
- Chen Z.L. and Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin // *Cell*, 1997, v. 91. P. 917—925.
- Savolainen K.M. et al. Interactions of excitatory neurotransmitters and xenobiotics in excitotoxicity and oxidative stress: glutamate and lead // *Toxicol. Lett.*, 1998, v. 28, № 102—103. P. 363—367.
- Tumbull S. et al. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease catalyses the formation of hydrogen peroxide in vitro // *Free Radical Biol. Med.*, 2001, v. 30. P. 1163—1170.
- Hong J.T. et al. Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury // *Brain Res. Bull.*, 2000, v. 53. P. 743—749.
- Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: A key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 284. P. 215—221.
- Min K., Jou I., Joe E. Plasminogen-induced IL-1 β and TNF- β production in microglia is regulated by reactive oxygen species // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, v. 312. P. 969—974.
- Gorovits R. et al. Glutamine synthetase protects against neuronal degeneration in injured retinal tissue // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1997, v. 94, № 13. P. 7024—7029.
- Freshney R.I. Culture of animal cells: a manual of basic techniques. W.-L., 2005.
- Боголепов Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга. М., 1976.
- Соколова Т.В. и др. Влияние ганглиозида GM1 на внутриклеточную концентрацию свободного кальция и жизнеспособность клеток PC12 при индукции окислительного стресса // *Нейрохимия*, 2005, т. 22, № 4. С. 266—272.

SUMMARY

A number of the experiments proved the importance of plasminogen (Pg), its active form, plasmin, plasmin activators and activators inhibitors for the physiology and pathology of the nervous system. It is known, that reactive oxygen species (ROS) can modulate the Pg action. In the given research we observed the evidence that Pg can sustain the viability of glioma C6 and neuroblastoma IMR-32 in the serum-free medium, as well as protect the cells of the rat sympathetic ganglia from the destructive action of the hydrogen peroxide. This fact has a particular significance because of ROS action in the development of the neurodegeneration.