

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК 2008 № 1

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК 2008 № 1

ЗАСНАВАЛЬНИК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 2004 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

В журнале публикуются работы, представленные на Международной научной конференции
«Протеолиз, механизмы его регуляции и его роль в физиологии и патологии клетки»
(Минск, 25–26 октября 2007 г.)

ЗМЕСТ

Никандров В. Н., Пыжова Н. С. Протеолиз как универсальный механизм регуляции биохимических и биологических процессов. Дискуссионные аспекты	4
Одинцов С. Г., Лапко А. Г., Сабала И., Бохтлер М. Структурно-функциональное исследование, классификация и механизм активации бактериальных аминопептидаз S и T	23
Румш Л. Д., Лихарева В. В., Михайлова А. Г., Горбачева Л. Р., Струкова С. М. Пути реализации уникальной специфичности энтеропептидазы. Физиологическая роль энтеропептидазы	31
Голубович В. П. Комплексный подход к получению синтетических пептидных ингибиторов эластазы	38
Плетень А. П. Устойчивость к протеиназам различных типов амилоидных структур, формируемых из пептидов β -амилоида ₁₋₄₂	43
Платонова Т. Н., Чернышенко Т. М., Савчук А. Н. Активация протромбина в присутствии высокомолекулярного E-фрагмента и стрептокиназы	48
Кирпиченок Л. Н. Белковый ингибитор цистеиновых протеиназ как активатор протеолиза	52
Домаш В. И., Шарпио Т. П., Забрейко С. А. Растительные ингибиторы протеолиза и перспективы их использования в медицине.	58
Бондарева Л. А., Немова Н. Н., Кяйвярйнен Е. И., Токарева Н. П. Внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы млекопитающих	64
Никандров В. Н., Жук О. Н., Пыжова Н. С., Гронская Р. И., Полукошко Е. Ф., Романовская А. А. Значение плазминогена как фактора трофического характера для культур клеток нервной ткани	85

*В. Н. НИКАНДРОВ, О. Н. ЖУК, Н. С. ПЫЖОВА, Р. И. ГРОНСКАЯ,
Е. Ф. ПОЛУКОШКО, А. А. РОМАНОВСКАЯ*

ЗНАЧЕНИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА КАК ФАКТОРА ТРОФИЧЕСКОГО ХАРАКТЕРА ДЛЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК НЕРВНОЙ ТКАНИ

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

(Поступила в редакцию 06.08.2007)

Одна из глобальных задач современной биологии, биотехнологии и инженерии клетки – наработка значительной массы (масштабирование) жизнеспособных клеток различных тканей человека и животных, в том числе таких высокодифференцированных, как нервная, для получения целевых продуктов биосинтеза, специфических для данных клеток, производства вирусных вакцин и т. д., а также для целей трансплантации.

В плане наработки клеток высокодифференцированных тканей особенно важным является обеспечение масштабной технологии факторами трофической поддержки, без которых невозможно получить высокопродуктивные жизнеспособные культуры, так же как и устранить действие повреждающих факторов.

Для роста и дифференциации клеток нервной ткани особое значение имеет ряд белков, включающих фактор роста эпидермиса – EGF (6 кДа), фактор роста нервов – NGF, нейротрофины NT-3, NT-4 (13.6–28.0 кДа), продуцируемые головным мозгом факторы – BDNF, CNTF, продуцируемый глией фактор – GDNF. Однако эти белки чрезвычайно дорогостоящи, что создает ряд трудноразрешимых проблем в использовании для биотехнологических целей очищенных образцов перечисленных протеинов. В данной ситуации целесообразны два подхода:

изыскание новых регуляторного типа белков, обладающих трофическим действием на клетки нервной ткани;

углубленное изучение структурно-функциональной специфики перечисленных выше белков с целью создания в перспективе (полу)синтетических миметиков этих трюфинов.

Изыскание новых белков регуляторного типа, обладающих трофическим действием на клетки нервной ткани

На основе изложенной концепции кислородзависимого пути активации плазминогена [1–7] с 1999 г. нами развернут комплекс исследований роли компонентов перичеселлюлярного протеолиза – плазминогена (Pg) и стрептокиназы в жизнедеятельности клеток нервной ткани на органических и диссоциированных культурах симпатических (краниально-шейного, шейно-грудного), чувствительных (спинальных) ганглиев, неокортекса и мозжечка, на перевиваемых линиях глиомы С6, нейробластомы IMR-32 и феохромоцитомы PC12.

Учитывая выявленную нами способность указанных белков образовывать устойчивые эквимольные комплексы с энзимами углеводно-энергетического метаболизма [8], в частности с пируваткиназой (PK), было изучено действие и этого белка.

Pg – гликопротеин сложной доменной структуры молекулярной массой 72–90 кДа. Под влиянием активаторов он превращается в плазмин – сериновую трипсиноподобную гидролазу. Роль системы Pg–плазмин, компоненты которой обнаружены в разнообразных клетках, почти во всех жидкостях организма, описана в целом ряде процессов на клеточном и тканевом уровнях. Сам

зимоген и его высокоаффинный рецептор амфотерин обнаружены в гомогенатах головного мозга; в нейронах гиппокампа мыши выявлены плазминоген и его мРНК [9]. Однако роль его в функциональной активности клеток и структур нервной системы остается малоизученной.

В настоящей статье изложено обобщение части собственных результатов экспериментальных исследований действия Pg, РК и их устойчивых эквимольных комплексов на жизнедеятельность клеток нервной ткани в органотипических, диссоциированных и перевиваемых культурах.

Чувствительные спинальные ганглии. При инкубации асептически извлеченных спинномозговых ганглиев 14-суточных крыс в питательной среде MEM, содержащей 0.5% эмбриональной телячьей сыворотки (ТС) с Pg (10^{-7} М), в течение 24 ч нейроны сохраняли структуру. При этом часто наблюдалась эктопия ядра, а состояние цитоплазмы, богато снабженной митохондриями, каналами шероховатого эндоплазматического ретикулума, нейрофибриллами, свидетельствовало об активном функциональном состоянии клеток [10, 11]. Характерным при данном воздействии было расширение межклеточных пространств между нейронами и мантийными глиоцитами и просветление экстрацеллюлярного матрикса (рис. 1). Глиальные клетки содержали множество крупных полиморфных лизосом. Одни – эллипсоидные с электронноплотной гомогенной сердцевинкой, окантованной более светлым ободком, другие – с темными гранулярными включениями, окруженными извитой мембраной. Кроме того, отмечена деструкция миелиновых оболочек, окружающих нервные отростки. Они становились неровными, прерывистыми, появлялись вздутия, расслоение и фрагментация. При этом аксоплазма выглядела неизменной, содержала митохондрии, нейрофибриллы, аксолема сохраняла свою непрерывность. Pg в концентрации 10^{-8} М вызвал лишь фрагментарное расслоение миелиновых ламелл, что может быть обусловлено превращением зимогена в плазмин.

В спинномозговых ганглиях крыс секретируются два различных активатора Pg: нейронами – урокиназного (uPA) и шванновскими клетками – тканевого (tPA) типа [12]. tPA действует как митоген или как ростовой фактор и вовлекается в клеточную реорганизацию, а uPA-ассоциированная плазминовая система инициирует клеточную пролиферацию, миграцию, рост клеток, тканевое ремоделирование, опухолевую инвазию и воспаление [13, 14]. Активные uPA и tPA генерируют плазмин в растворе или на специфическом рецепторе. Полученный плазмин может разрушать компоненты экстрацеллюлярного матрикса, а также активировать зимогены протеаз, цитокинов и гормонов.

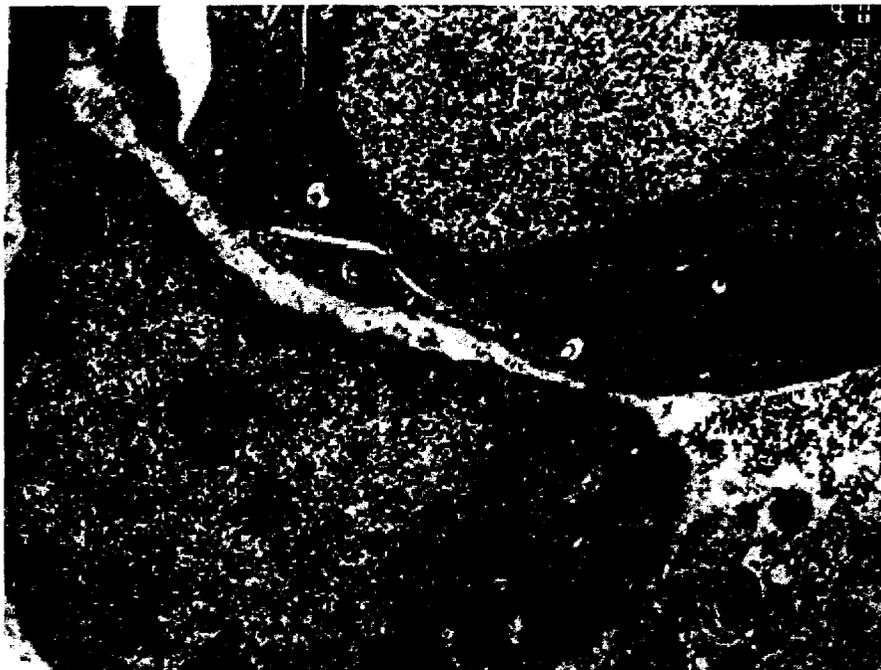


Рис. 1. Нарушение нейроглиальных контактов при воздействии плазминогена (10^{-7} М) на ткань спинального ганглия в течение 24 ч. Ув. 4000 [10, 11]

В отличие от NGF (100 нг/мл), оказывавшего выраженный трофический эффект, добавление в среду Pg +NGF вызвало трипсиноподобный эффект при обеих концентрациях Pg (10^{-8} и 10^{-7} М): дезинтеграцию миелиновых оболочек, расширение экстрацеллюлярных пространств между нейрональными и глиальными клетками, просветление межклеточного матрикса [11]. Это может быть обусловлено Pg-активаторной способностью NGF [15].

В органной культуре спинномозговых ганглиев на питательной среде, содержащей 10% ТС, уже в первые сутки *in vitro* отмечено разрыхление эксплантата и движение оболочечных и глиальных клеток, затем – интенсивный вырост регенерирующих отростков в радиальном направлении [16–18]. Все эти элементы образовывали зону роста ганглия, состоящую через 6–8 сут из пролиферирующих глиальных, оболочечных клеток и фибробластов, окружающих эксплантат, который к этому сроку уплотнялся и распластывался по покровному стеклу. Сквозь его толщу (особенно по краю) просматривались отдельные нейроны. На 9–15-е сутки при исследовании в фазовом контрасте наблюдали двухконтурность нейритов, что свидетельствовало о начале их миелинизации. Добавление NGF на 2-е сутки интенсифицировало радиальный вырост нейритов из эксплантата, а на 4-е сутки *in vitro* увеличение зоны роста по отношению к контролю становилось статистически значимым. При введении в среду Pg (10^{-9} – 10^{-7} М) зона роста состояла в основном из ненейрональных элементов, встречались нейроны, вышедшие за пределы эксплантата и окруженные сателлитными клетками. Ее размер увеличивался достоверно от контроля при концентрации Pg 10^{-9} М уже через 24 ч за счет миграции выселившихся из эксплантата клеток на большее расстояние. Зона роста при этом оказалась менее плотной. При добавлении в среду Pg (10^{-7} М) + NGF возрастала численность мигрировавших клеток и плотность отростков. Спустя 7–10 сут отмечено увеличение количества нейритов, формирующих пучки, а также обширная, часто многослойная, зона роста. При использовании Pg в концентрации 10^{-9} – 10^{-8} М в течение недели граница эксплантата размывалась, часто далеко в зоне роста обнаруживались нейроны, однако появлялись единичные клетки, окрашиваемые 0.2%-ным раствором трипанового синего. Повышение уровня Pg до 10^{-7} М усиливало появление нежизнеспособных клеток. Вследствие интенсивной миграции за пределы эксплантата оболочечных и глиальных клеток четко просматривались нейроны, находящиеся в его пределах. Воздействие Pg и NGF на спинальные ганглии в питательной среде, содержащей 0.5% телячьей сыворотки крови, приводило к аналогичным результатам, запаздывающим лишь на 2–3 сут [16–18].

Исследования методом лизиса фибриновых пластин показали, что питательная среда, содержащая 10% ТС, не обладает собственной фибринолитической или Pg-активаторной способностью, но содержит Pg, способный активироваться при добавлении стрептокиназы. Уровень такого зимогена при уменьшении содержания ТС до 0.5% резко снижается, и он не определяется указанным методом. При этом используемые образцы ТС были либо полностью лишены антиплазминовой активности, либо отличались достаточно высоким уровнем ее, который проявлялся даже при содержании в среде всего 0.5% ТС [19].

В культуральной жидкости органотипической культуры этих ганглиев, выращиваемых в обогащенной ТС питательной среде, через 6 сут уровень плазминогена падал, проявлялась Pg-активаторная способность и заметная антиплазминовая активность (табл. 1). Судя по полученным данным, зрелая культура, переведенная на дефицитную по белкам сыворотки крови среду, не снижала секрецию в культуральную жидкость активаторов Pg и антиплазминов. Последующее обогащение такой культуры ТС способствовало истощению Pg при нарастании антиплазминовой активности.

Органотипическая культура спинальных ганглиев и на среде дефицитной по белкам сыворотки крови (0.5% ТС) через 5 сут секретировала Pg в культуральную жидкость.

Симпатические ганглии. На органной культуре симпатических ганглиев взрослых крыс показано [20], что суточная экспозиция с глутаматом (10^{-4} М) эксплантатов краниально-шейных ганглиев приводит к развитию в нейронах деструктивных изменений, протекающих как по некротическому, так и по апоптотическому типу (рис. 2). В первом случае отмечались расширение цистерн эндоплазматического ретикулаума, набухание митохондрий, вакуолизация нейроплазмы и нарушение целостности наружной мембраны, во втором – неправильная форма ядер,

Таблица 1. Изменения компонентов системы плазминоген–плазмин в культуральной жидкости органотипических культур спинномозгового ганглия или культур феохромоцитомы PC12 [19]

Варианты эксперимента	Фибринолит. активность, мм ²	Содержание плазминогена, мм ²	Плазминоген-активаторная способность, мм ²	Антиплазминовая активность, %
I. Питательная среда, содержащая 10% ТС (контроль)	0	45.5	0	0
Спинальные ганглии (культивирование 6 сут)	0	36.0	33.5	39.2
Спинальные ганглии (культивирование 13 сут): с последующей заменой бессывороточной средой (через 3 сут)	0	0	28.2	36.4
с заменой после 16 сут питательной средой с 10% ТС (культивирование 2 сут)	0	0	19.2	70.0
II. Питательная среда, содержащая 0.5% ТС (контроль)	0	0	0	Не исслед.
Клетки PC12 (24 ч культивирования)	0	0	0	Не исслед.
Клетки PC12, праймированные NGF в течение 72 ч	0	0	127.2	Не исслед.
Праймированные клетки PC12 + плазминоген (на 24 ч),	0	0	297.8	Не исслед.
10 ⁻⁶ М	0	0	175.5	Не исслед.
10 ⁻⁹ М	0	0	150.5	Не исслед.
10 ⁻¹⁰ М	0	0	150.5	Не исслед.
Клетки PC12, праймированные NGF в течение 96 ч: + H ₂ O ₂ , 5×10 ⁻⁴ М (20 мин)	0	60.0	66.0	Не исслед.
+ плазминоген (24 ч),	0	72.7	113.5	Не исслед.
2×10 ⁻⁶ М	0	5.6	101.1	Не исслед.
2×10 ⁻⁹ М	0	5.6	101.1	Не исслед.

конденсация хроматина у внутренних мембран, их эктопия и исчезновение ядрышек, осмиофилия ядер и цитоплазмы с появлением отделяющих указанные структуры друг от друга перинуклеарных участков просветления, формирование патологических мембранных комплексов митохондрий, обилие электронноплотных включений типа лизосом и др. Совместное воздействие глутамата и P_g (10⁻⁷ М) сопровождалось практически полным исключением некротических изменений при сохранении явлений апоптоза. В этом заключалось отличие эффекта P_g от эффекта NGF, воздействие которого совместно с глутаматом вело к заметному ослаблению и апоптотического компонента: ультраструктура основной массы нейронов сохранялась, нарастала общая численность митохондрий – от крупных до новообразованных мелких. Это может свидетельствовать об активации энергетического метаболизма симпаточитов. Не менее демонстративным явилось защитное действие зимогена при деструкции клеток краниального шейного ганглия, вызванной 10⁻⁴ М H₂O₂ (рис. 2) [21, 22].

На диссоциированной культуре ганглиев показано, что добавление к инкубационной среде P_g (10⁻⁹–10⁻⁷ М) на 1–3-и сутки не вызывает существенных морфологических изменений (размер нейрона, положение ядра и ядрышек, прозрачность цитоплазмы, длина и ветвистость нейритов и их целостность) в развитии нейробластов. Спустя 5–8 сут при концентрации зимогена 10⁻⁷ М у 40% клеток наблюдалось нарушение непрерывности отростков, а у 30% – зернистость сомы и исчезновение четкой границы между ядром и цитоплазмой нейронов [23, 24].

Исследования показали [23, 24], что при замене экзогенного NGF плазминогеном в концентрации 10⁻⁷ М P_g поддерживал дальнейшее развитие симпатобластов в течение 3–4 сут: нейриты продолжали расти, начиналось их ветвление. Затем дифференцировка нейробластов прекращалась. Но если культуры развивались на фидерном слое из ненейрональных клеток, жизнеспособность отдельных нейронов сохранялась до 30 сут. В концентрации 10⁻⁹–10⁻⁸ М P_g был неэффективен, клетки округлялись и гибли через 2–3 сут.

Воздействие H₂O₂ в концентрации 5·10⁻⁴ М в течение 20 мин нарушало однородность 6–7-суточных культур диссоциированных нейробластов краниально-шейного ганглия новорожденных крыс. Нейробласты в стандартных условиях культивирования к этому времени достигали двукратного увеличения сомы (до 20–30 мкм в диаметре), и наблюдалась регенерация нейритов с образованием сети. У части культур образовывалась подложка из клеток ненейронального про-

исхождения: фибробластов, глии, оболочечных клеток. Эффект гидропероксида выразался в уменьшении размеров около 10% клеток при сохранности нейритов и глиальных элементов. Но спустя 2–3 сут отмечалось разрушение отростков и сомы примерно у 40% нейробластов [24].

Добавление в среду Pg (10^{-7} М, но не 10^{-9} М) было способно оказать протекторно-репаративный эффект, что при указанном воздействии H_2O_2 выразалось в уменьшении доли поврежденных клеток – с 10 до 5–6% и с 40 до 20% спустя 20 мин или 2–3 сут соответственно после воз-

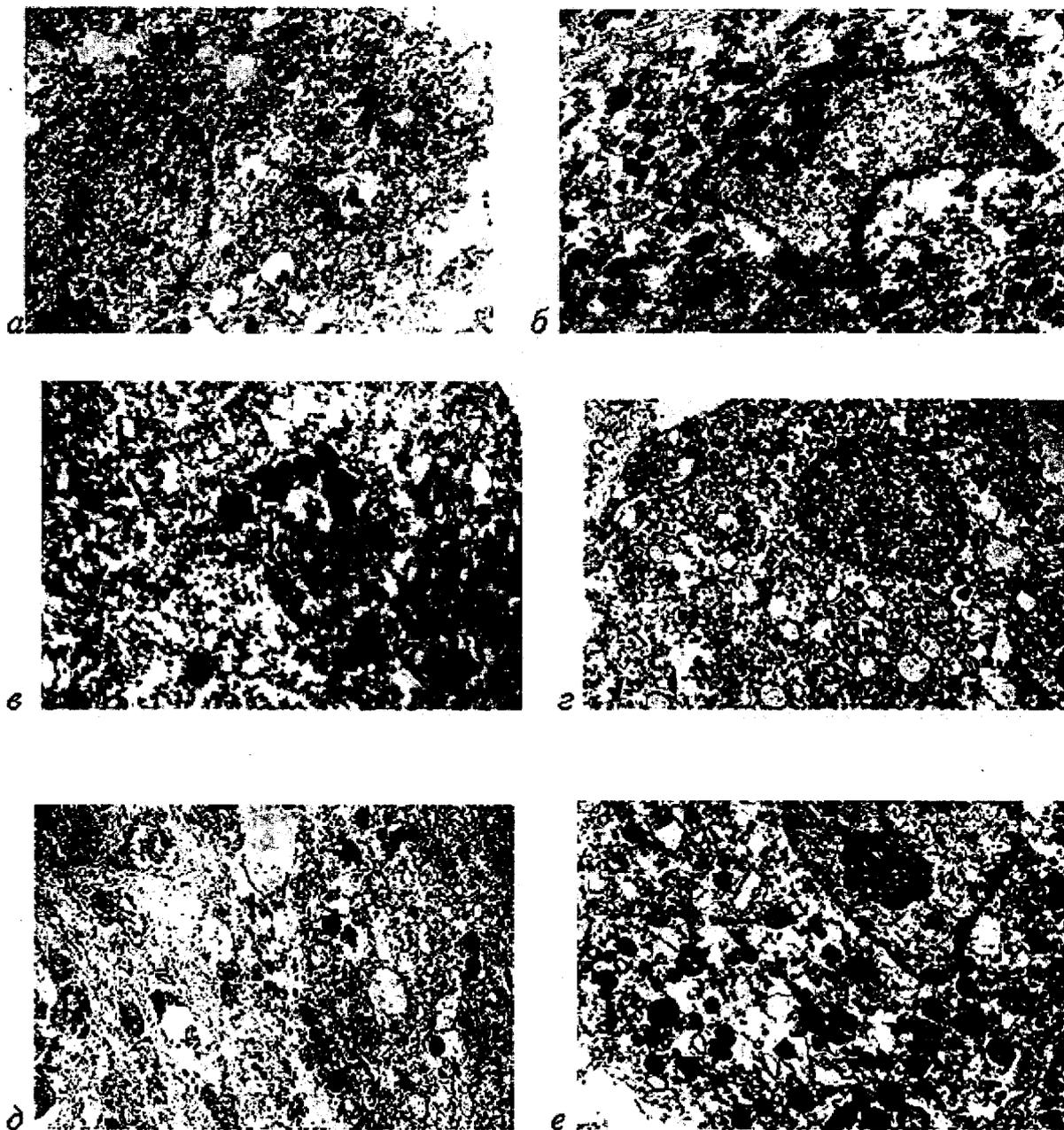


Рис. 2. Влияние плазминогена совместно с глутаматом и пероксидом водорода на ультраструктуру симпатических нейронов. Органная культура краниального шейного ганглия взрослой крысы (питательная среда DMEM + 0.5% эмбриональной телячьей сыворотки, 24 ч *in vitro*): а – глутамат (10^{-4} М), деструктивные изменения нейрона по некротическому типу (ув. 8000); б – глутамат (10^{-4} М), деструктивные изменения нейрона по апоптотическому типу (ув. 6000); в – глутамат (10^{-4} М) + плазминоген (10^{-7} М), деструктивные изменения нейрона по апоптотическому типу (ув. 6000); г – глутамат (10^{-4} М) + фактор роста нервов (100 нг/мл), увеличение количества и размеров митохондрий (ув. 8000); д – пероксид водорода (10^{-4} М), деструктивные изменения нейрона по некротическому типу (ув. 5000); е – пероксид водорода (10^{-4} М) + плазминоген (10^{-7} М), сохранность основных структурных компонентов нейрона (ув. 5000) [20–22]

действия гидропероксида. Деструкция отростков (нарушение непрерывности волокна, появление зернистых включений по ходу нейритов) наблюдалась реже. Иногда встречались клетки-тени. Кстати, в органотипической культуре эти ганглии также способны синтезировать активируемый Pg [24].

Воздействие Pg в концентрации 10^{-9} – 10^{-7} М в течение 40 мин увеличивало в нейробластах активность сукцинатдегидрогеназы [23].

Экспозиция диссоциированных симпатобластов в присутствии 0.01 М NH_4Cl в течение 24 ч вызвала значительные повреждения зоны роста и гибель 70% нейронов, через 3 сут – 100%. Предварительная инкубация культур симпатобластов в присутствии 10^{-9} М или 10^{-7} М Pg уменьшала долю погибших клеток до 30 и 20% соответственно. Действие зимогена в концентрации 10^{-7} М было сильнее – даже через 30 сут отдельные нейроны все еще были жизнеспособны [24].

Клетки коры головного мозга и мозжечка. В органотипической культуре неокортекса и мозжечка новорожденных крыс через 72 ч после введения в питательную среду, содержащую 0.5% ТС, 10^{-7} – 10^{-8} М Pg отмечено значительное увеличение количества и длины отростков, а также усиление их арборизации. Зона роста уплотнялась в результате указанных процессов и за счет миграции из эксплантатов глиальных клеток, макрофагов и немногочисленных нейронов. Индекс пролиферации культур неокортекса и мозжечка возрастал на 49 и 57% соответственно в сравнении с контролем [25]. Это указывает на стимуляцию плазминогеном генерации отростков и миграции клеток в исследуемых культурах.

В диссоциированной культуре неокортекса через 72 ч культивирования при добавлении 25% ТС прикрепляемость клеток культур составила 80% (отростки появлялись у единичных клеток), при введении же в среду Pg (10^{-7} – 10^{-8} М) – 87% (отростки появлялись у большинства клеток) [25]. Следовательно, Pg интенсифицировал регенеративные процессы и созреваемость клеток.

Клетки глиомы С6 и нейробластомы IMR-32. Установлено, что через 24 ч культивирования глиомы С6 в бессывороточной среде жизнеспособность клеток была на уровне 95–98%. Через 72 ч культивирования регистрировали уменьшение доли жизнеспособных клеток в 7.5 раза (рис. 3). Pg в концентрации 10^{-7} – 10^{-11} М обеспечивал сохранение жизнеспособности клеток на уровне контроля [26, 27].

При культивировании клеток нейробластомы IMR-32 продемонстрирована сходная картина (рис. 3). Через 72 ч экспозиции этих клеток в питательной среде, содержащей 0.5% ТС, доля живых клеток в контроле не превышала 35%, тогда как при добавлении Pg жизнеспособность клеток IMR-32 не уменьшалась [27].

Через 72 ч в контроле деление клеток глиомы и нейробластомы прекращалось, а Pg способствовал поддержанию жизнедеятельности клеток в бессывороточной среде. Действие зимогена на клетки С6 при всех исследуемых концентрациях вело к росту индекса пролиферации в 2.2–

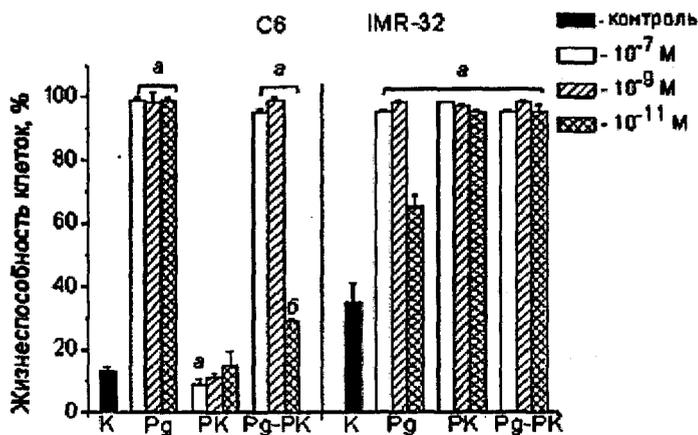


Рис. 3. Жизнеспособность клеток глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 через 72 ч культивирования с плазминогеном, пируваткиназой или их эквимоллярными комплексами. Достоверность отличий ($P < 0.05$): а – от контроля, б – от эффекта индивидуальных белков, входящих в состав комплекса [26, 27]

2.8 раза, а индекса пролиферации клеток нейробластомы IMR-32 в 1.5 раза [27, 28]. Эффект Pg через 24 ч выразался в увеличении содержания РНК и белка в клетках глиомы С6 и нейробластомы IMR-32, а через 72 ч регистрировали и увеличение концентрации ДНК (рис. 4).

Стимулирующий эффект Pg на клетки глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 подтвержден и результатами прижизненного микроскопического исследования (рис. 5). Добавление Pg в бессывороточную среду культивирования способствовало формированию более плотного монослоя клеток С6 и IMR-32, а также препятствовало развитию дегенеративных изменений в клеточном пласте.

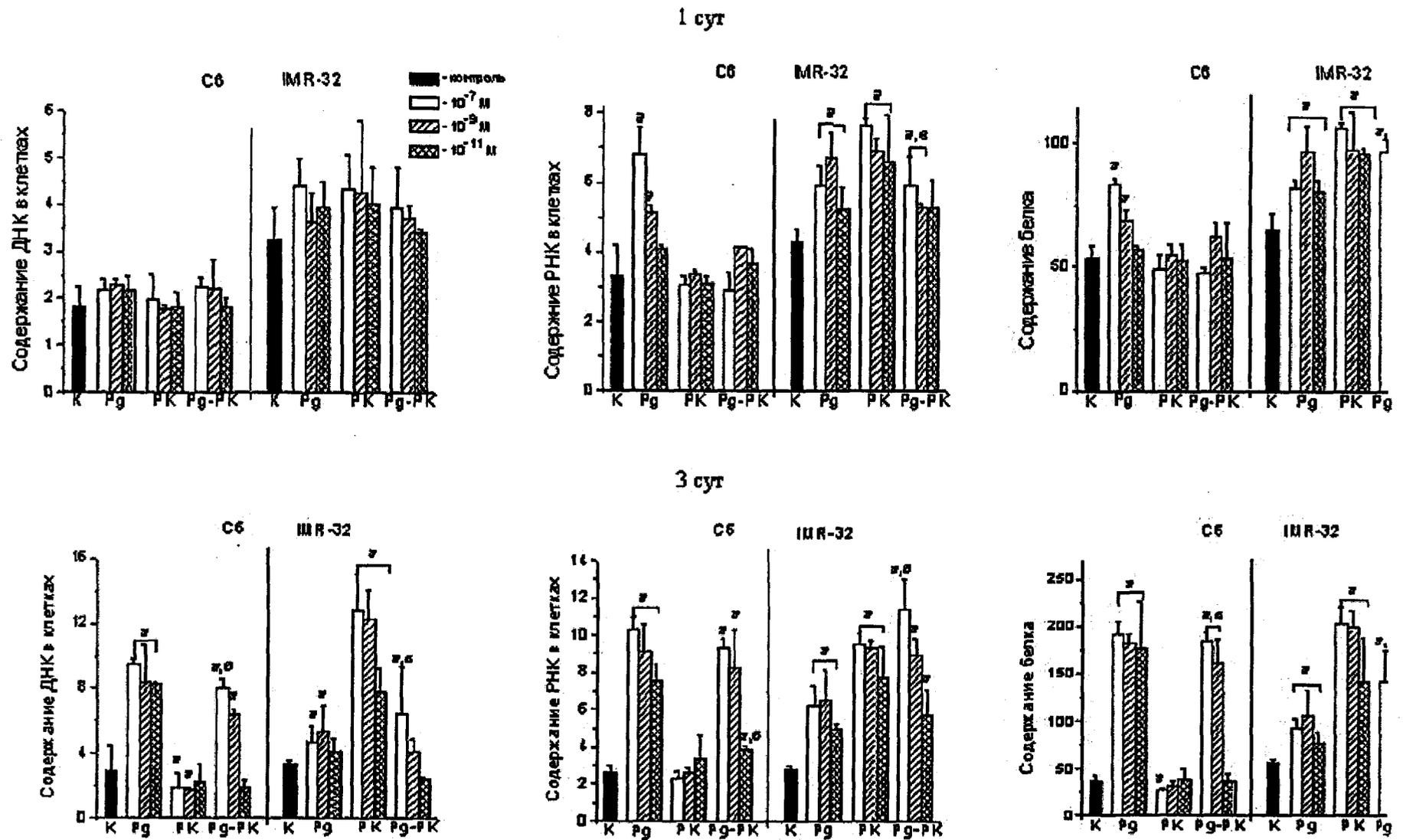


Рис. 4. Изменения содержания макромолекул в клетках глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 под воздействием плазминогена, пируваткиназы или их эквимольного комплекса. Достоверность отличий ($P < 0.05$): а – от контроля; б – от Prg; в – от PK; z – от эффекта индивидуальных белков, входящих в состав комплекса [26, 27]

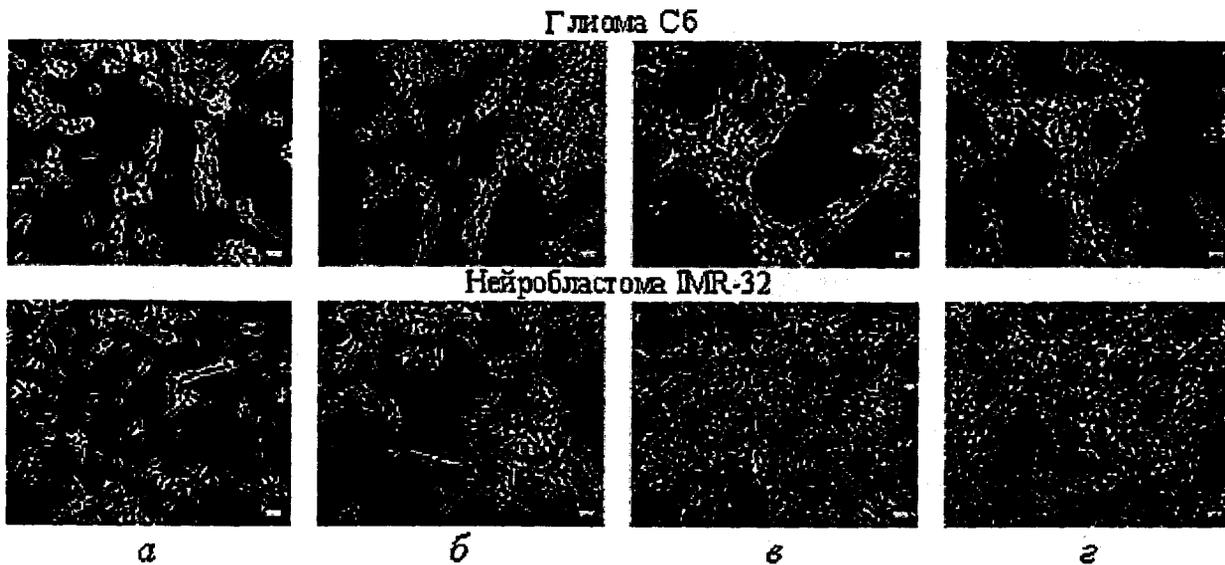


Рис. 5. Изменения морфологии клеток глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 при культивировании в бессывороточной среде (контроль, а) или в питательной среде с добавлением плазминогена (б), пируваткиназы (в), комплекса плазминоген-пируваткиназа (г). Все агенты вносили в среду культивирования в концентрации 10^{-7} М. Фазовый контраст (увеличение объектива $\times 16$). Масштабная линейка – 25 мкм [26–29]

Направленность эффекта РК зависела от типа клеток. Так, введение РК в среду культивирования оказывало стимулирующее действие на пролиферацию клеток нейробластомы IMR-32 и их жизнеспособность (но не глиомы С6). Причем оно проявлялось даже сильнее, чем действие Pg (см. рис. 4).

Через 24 ч культивирования нейробластомы с РК рост пролиферации клеток на 25% выявлен лишь при концентрации энзима 10^{-7} М, а содержание РНК и белка было повышено на 53–77 и 48–64%. Через 72 ч в присутствии 10^{-7} – 10^{-11} М РК индекс пролиферации увеличился в 2.3–2.5 раза (см. рис. 3). В присутствии РК наблюдали также увеличение (на 18–195%) содержания макромолекул в клетках IMR-32. Эффект эквимольного комплекса Pg–РК был сходен с действием зимогена. В концентрации 10^{-7} М он вызвал повышение уровней ДНК, РНК, белка и численности клеток на 65, 92, 47 и 92% соответственно.

Кратковременная (20 мин) экспозиция клеток глиомы С6 с Pg в концентрации 10^{-9} М или 10^{-7} М заметно не влияла на уровень внутриклеточного протеолиза, активируемого АТФ или ионами Ca^{2+} (5 мМ), вместе с тем протеолиз, активируемый в присутствии 50 мкМ Ca^{2+} , заметно подавлялся (на 90%), особенно при концентрации зимогена 10^{-9} М (рис. 6).

Клетки феохромоцитомы PC12. Pg способен снижать гибель клеток PC12, вызываемую депривацией сыворотки крови. Культивирование клеток с зимогеном на протяжении 24 ч при кон-

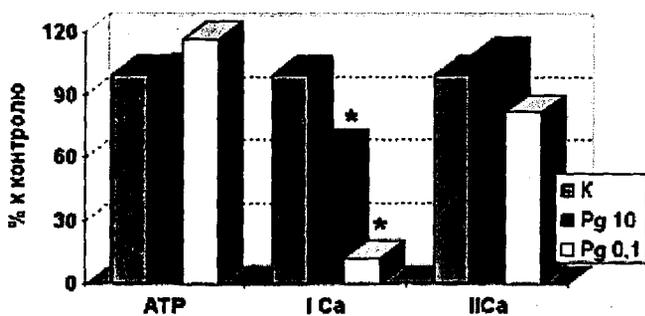


Рис. 6. Влияние плазминогена на уровень АТФ- и Ca^{2+} -активируемого протеолиза в клетках глиомы С6. Время инкубации – 20 мин; I Ca – протеолиз, активируемый 50 мкМ Ca^{2+} ; II Ca – протеолиз, активируемый 5 мМ Ca^{2+} . * – $P < 0.05$ [17]

центрации $\geq 10^{-7}$ М в среде, содержащей 0.5% ТС, снижало долю погибших клеток с 13 до 2–4%, а продолжение культивирования до 3–7 сут при концентрации Pg 10^{-8} и 10^{-11} – в 2–7 раз (рис. 7) [23].

После суточного воздействия зимогена (10^{-11} – 10^{-6} М) в среде, содержащей 0.5% сыворотки, изменений активности лактат-, сукцинат- и NADH-дегидрогеназ не выявлено (табл. 2). Активность ферментов по гистохимической реакции была умеренной, ядра не окрашивались, выявлялись ядрышки. Введение в среду зимогена в концентрации 10^{-7} М через 24 ч вело к уменьшению со-

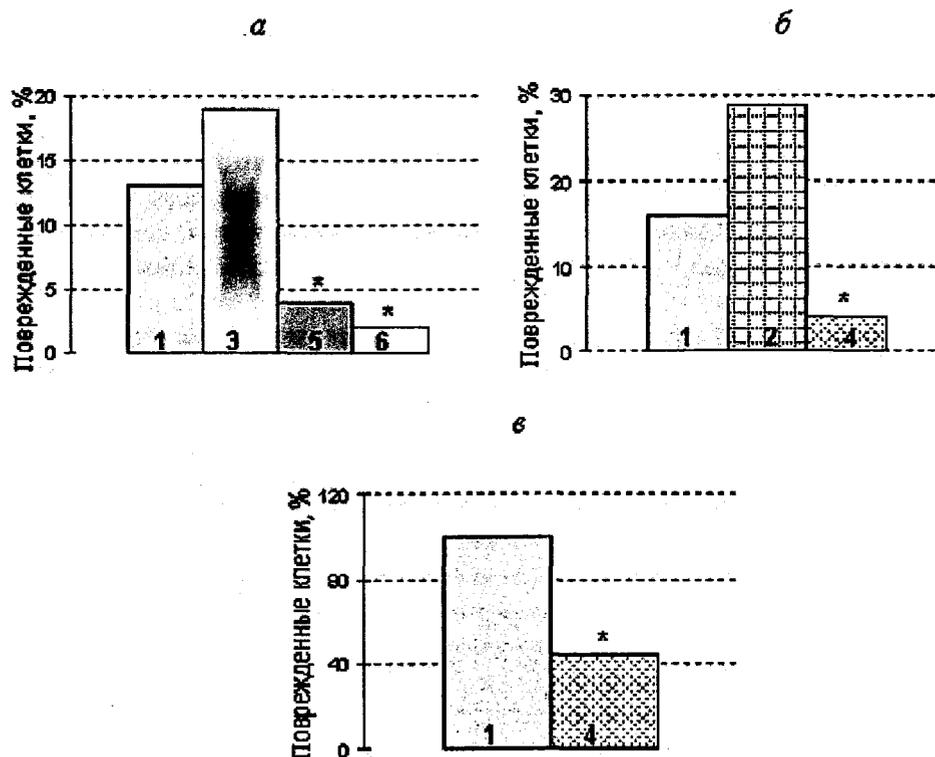


Рис. 7. Влияние плазминогена на жизнеспособность клеток феохромоцитомы РС12 при культивировании на питательной среде, не содержащей сыворотки крови, в течение 24 ч (а) и на среде, содержащей 0.5% сыворотки крови, через 3 (б) и 7 сут (в). Концентрация плазминогена: 1 – контроль; 2 – 10^{-11} М; 3 – 10^{-10} М; 4 – 10^{-8} М; 5 – 10^{-7} М; 6 – $2 \cdot 10^{-6}$ М. * – $P < 0.05$ [23]

держания катехоламинов, по данным гистохимической реакции, на 27% ($P < 0.01$). Подобный эффект через 48 ч оказывало и воздействие Pg в концентрации 10^{-11} и 10^{-8} М ($P < 0.01$) [30].

Исследование влияния Pg на клетки РС12, дифференцирующиеся под воздействием NGF (100 нг/мл, 3 сут) в нейроноподобные, показало изменение активности ацетилхолинэстеразы, лактатдегидрогеназы, но не сукцинатдегидрогеназы. В этих клетках Pg в концентрации 10^{-6} М через 24 ч вызывал снижение активности лактатдегидрогеназы на 37% ($P \leq 0.05$) и способствовал росту активности ацетилхолинэстеразы на 25% ($P < 0.05$), а в концентрации 10^{-11} – 10^{-9} М – росту активности лактат- и NADPH-дегидрогеназ [30, 31]. В препаратах, окрашенных на активность лактатдегидрогеназы, выявлены клетки со слабой, умеренной и высокой активностью энзима. При увеличении концентрации Pg количество последних уменьшалось.

Внесение в культуральную среду H_2O_2 ($5 \cdot 10^{-4}$ М, 20 мин) привело к увеличению доли нежизнеспособных клеток РС12 с 10.9 до 25.2% и повышению в сохранившихся активности лактатдегидрогеназы на 28.4% ($P < 0.05$). При последующей замене питательной среды, содержащей H_2O_2 , на среду с добавлением Pg ($2 \cdot 10^{-7}$ М и $2 \cdot 10^{-9}$ М) и 24-часовом культивировании доля нежизнеспособных клеток составила только 5%, активность лактатдегидрогеназы в сравнении с обработанными гидропероксидом клетками снижалась на 52 и 37.6% ($P < 0.05$), а в сравнении с контролем – на 39 и 38% соответственно ($P < 0.05$) [30]. Вместе с тем ни H_2O_2 ($5 \cdot 10^{-4}$ М, 20 мин), ни добавление Pg на 1 сут не вызывали изменения активности лактатдегидрогеназы в клетках, праймированных в течение 3 сут фактором роста нервов (100 нг/мл).

Таблица 2. Активность дегидрогеназ (усл. ед.) в клетках РС12 при культивировании их с плазминогеном на среде, содержащей 0.5% сыворотки крови, в течение 24 ч [31]

Энзим	Концентрация плазминогена				
	Контроль	10^{-11} М	10^{-9} М	10^{-8} М	10^{-6} М
Лактатдегидрогеназа	91.5±6.1	83.6±6.3	85.1 ±1.9	90.3±2.7	103.7±7.5
Сукцинатдегидрогеназа	51.1±1.9	52.1±3.3	Не исслед.	Не исслед.	51.7±2.9
NADH-дегидрогеназа	75.9±3.9	79.1±2.5	Не исслед.	Не исслед.	69.6±3.2

Кратковременная (20 мин) экспозиция клеток PC12 с P_g сопровождалась снижением интенсивности АТР-активируемого протеолиза на 27–50 % в зависимости от концентрации зимогена. Концентрационная зависимость эффекта имела сложный характер. Но даже при концентрации 10 нг/мл NGF снимал эффект зимогена. Уровень протеолиза, активируемого низкими концентрациями Ca²⁺ (50 мкМ), при добавлении зимогена в диапазоне концентраций 0.01–1.0 мкг/мл (10⁻¹⁰–10⁻⁷ М) подавлялся в 3.3–5.0 раза, а при его концентрации 10 мкг/мл возрастал в 1.4 раза. Данный эффект также снимался NGF. Активируемый 5 мМ Ca²⁺ протеолиз при концентрации зимогена 0.01 мкг/мл возрастал в 1.8 раза, а при концентрации 1.0–10.0 мкг/мл белка (10⁻¹⁰–10⁻⁷ М) снижался в 2.5–3.3 раза [32].

Обнаружено, что клетки PC12, выращенные на бессывороточной питательной среде, не обладают собственной фибринолитической активностью, содержат следы активируемого P_g, но обладают P_g-активаторной способностью и секретируют активаторы P_g в культуральную жидкость [19].

Таблица 3. Активность лактат- и NADPH-дегидрогеназ в клетках PC12, праймированных NGF, через 24 ч после добавления плазминогена [31]

Энзим	Концентрация плазминогена					
	Контроль	10 ⁻¹¹ М	10 ⁻⁹ М	10 ⁻⁸ М	10 ⁻⁷ М	10 ⁻⁶ М
Лактат-дегидрогеназа	41.4 ± 3.9	61.2 ± 3.2*	56.9 ± 3.4*	Не исслед.	Не исслед.	Не исслед.
NADPH-дегидрогеназа	75.4 ± 4.7	100.1 ± 4.3*	103.5 ± 5.3*	89.9 ± 2.5	85.9 ± 3.5	86.1 ± 8.9

* Достоверные отличия по отношению к контролю при $P < 0.05$.

При культивировании таких клеток на питательной среде, содержащей 0.5% ТС, в культуральной жидкости P_g-активаторная способность не определялась (см. табл. 1). Вместе с тем праймированные NGF клетки феохромоцитомы секретируют субстанции, активирующие P_g. Внесение в питательную среду таких клеток P_g (10⁻¹⁰–10⁻⁶ М) заметно увеличивало P_g-активаторную способность культуральной жидкости. Обработка праймированных клеток H₂O₂ резко снижала ее и обнаруживала присутствие активируемого P_g. Введение в культуру таких клеток P_g увеличивало P_g-активаторную способность культуральной жидкости, однако это не приводило к полному исчезновению в ней активируемого P_g.

Все эти факты наглядно демонстрируют достаточно сильное и вместе с тем сложное воздействие P_g на клетки нервной ткани, характер которого зависит не только от концентрации зимогена и типа клеток, но и от их конкретного состояния.

Изучение структурно-функциональной специфики фактора роста нервов

Фактор роста нервов – белок общей молекулярной массой 131 кДа, содержащий один-два атома цинка. Вероятнее всего, он является пентамером (7S NGF), включающим по две α- и γ-субъединицы и одну β-субъединицу. Данные о структуре и биологических свойствах протеина обстоятельно проанализированы в ряде монографий и обзорных статей. Фактор роста нервов (NGF) считают ответственным за дифференцировку и пролиферацию адренергических симпатических и сенсорных нейронов периферической нервной системы, холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга, регенерацию нервов. Установлено участие его в симпатической передаче возбуждения, Ca²⁺-зависимой стимуляции выхода ацетилхолина, дифференцировке, пролиферации и биосинтетических свойствах клеток иммунной системы.

Несмотря на многолетние исследования свойств молекулы NGF, до сих пор остается не совсем ясной природа его биологической активности на молекулярном уровне. Среди данных литературы о функциональных свойствах NGF и его субъединиц примечательным было выявление у γ-субъединицы P_g-активаторной способности. Вместе с тем считалось, что остальные субъединицы (α- и β-) лишены подобных свойств.

Проведенные нами исследования образцов NGF и его субъединиц высокой степени чистоты (по данным электрофореза и изоэлектрофокусирования) показали наличие такой активности и у

β -субъединицы (основного носителя нейроростовой активности) [33–35]. В отличие от истинных активаторов P_g кинетика активации зимогена γ - и β -субъединицами характеризовалась весьма продолжительной lag-фазой. P_g-активаторная способность β -субъединицы не превышала 42% таковой γ -субъединицы, при этом α -субъединица была полностью лишена подобной способности. Группоспецифические ингибиторы протеиназ – р-хлормеркурибензоат, 8-оксихинолин и о-фенантролин умеренно угнетали активность лишь β -субъединицы – на 33 и 22–25% соответственно. Перехватчик супероксидного радикала – нитротетразолиевый синий значительно уменьшал P_g-активаторную способность олигомера фактора и его субъединиц (β -субъединицы – полностью). Возможно, в P_g-активаторной функции NGF и его субъединиц участвует супероксидный радикал.

NGF, его γ -субъединица не расщепляют белки типа фибрина, гемоглобина, казеина. Вместе с тем нами найден подходящий субстрат – белок с основными свойствами, эффективно расщепляемый при pH 7.4 не только γ -, но и β -субъединицей NGF [33].

Методом люминолзависимой хемилюминесценции показано [33–35], что в присутствии γ - и β -субъединиц (но не α -) наблюдается резкая вспышка хемилюминесценции с последующим затуханием, свидетельствующим о разложении H₂O₂ с образованием активных форм кислорода. С помощью двух модельных систем генерирования супероксидного радикала установлено, что и олигомер, и субъединицы подавляют редукцию нитротетразолиевого синего. При pH 7.6 7S NGF, α -, β - и γ -субъединицы ингибировали восстановление нитротетразолиевого синего в модельной системе генерирования супероксидного радикала на 40, 60, 28 и 41–52% соответственно [34–35].

Методом лизиса ДНК селезенки или тРНК дрожжей в тонком агаровом слое с последующей визуализацией зон лизиса путем обработки 2 н HClO₄ установлена эндонуклеазная активность при pH 7.4 по обоим субстратам у всех трех субъединиц [33]. Обе эндонуклеазные активности проявлялись β -субъединицей по сравнению с другими при более низких ее концентрациях. Однако эта зависимость у β -субъединицы в обоих случаях имела вид кривой с насыщением, тогда как активность α - и γ -субъединиц в широком диапазоне концентраций изменялась практически линейно.

Исследования действия традиционных эффекторов эндонуклеаз – ионов Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, а также ЭДТА, цитрата, арсенита, L-лизина, L-гистидина и L-аргинина в конечной концентрации (10⁻³ М) показали, что ДНК-азную активность α -субъединицы все эффекторы подавляли на 50–65%. ДНК-азная активность β -субъединицы повышалась при добавлении цитрата, ЭДТА, арсенита или ионов Cu. Эта же активность γ -субъединицы почти всеми эффекторами подавлялась на 20–40% (кроме ионов Ca, Co, аргинина), а ионами Cu стимулировалась [33].

РНК-азная активность α -субъединицы лишь в присутствии арсенита или лизина возрастала на 30–40%, активность β -субъединицы была мало чувствительна к эффекторам (лишь ЭДТА несколько угнетал ее), а γ -субъединицы подавлялась (на 20–45%) всеми катионами металлов [33]. Все эти факты дают основание полагать, что субъединицы NGF обладают независимыми центрами, катализирующими расщепление нуклеиновых кислот.

Следовательно, у олигомера NGF и его субъединиц обнаружен ряд ранее неизвестных функциональных свойств. Это обстоятельство позволяет по-новому взглянуть на структурно-функциональную специфику данного регуляторного белка и на пути реализации его биологического действия. Ранее в литературе высказывались суждения относительно более сложного механизма действия NGF на клетку-мишень: не только путем взаимодействия со специфическим рецептором плазматической мембраны (хотя характер этого взаимодействия остается недостаточно ясным), но и путем расщепления белка, связывающего инсулин-подобный фактор роста [36], а также воздействия на NGF-рецептор ядра [37, 38]. Последний аспект в свете обнаружения у субъединиц NGF эндонуклеазной активности приобретает особый смысл. Кроме того, изложенные факты создают предпосылки к проведению поисковых работ по созданию NGF-миметиков и раскрытию, наконец, структурных основ проявления их функциональных особенностей.

Заключение. Изложенные материалы позволили предложить приемы культивирования клеток нервной ткани (на дефицитной по белкам сыворотке крови питательной среде 0.5% ТС вместо 15–25%), обеспечивающие ускорение созревания, улучшение адгезии, высокую выживаемость,

увеличение количества и длины отростков, их арборизации [39]. В частности, такой результат получен на культурах тканей неокортекса и мозжечка [25]. Выявлены особенности ультраструктурных перестроек клеток нервной ткани (нейронов, астроцитов, олигодендроцитов), отражающие протекторное действие P_g. В присутствии P_g общее число клеток глиомы С6 возросло в несколько раз. В целом предложенные решения позволяют отказаться от использования насыщенных белками сыворотки крови сред при наращивании клеток или ограничить использование подобных сред. Более того, подобный подход существенно облегчает выделение целевых белков метаболитов из культуральной жидкости (кондиционированной питательной среды).

Исследования функциональных свойств олигомера NGF и трех его субъединиц позволили установить их неизвестные ранее свойства: участие в протеолитических процессах (P_g-активаторную и прямую протеолитическую активность), генерировании и трансформации активных форм кислорода, прежде всего супероксидного радикала, а также эндонуклеазную (ДНК-азную и РНК-азную) активность. Эти факты позволяют не только переосмыслить механизмы биологического действия NGF, но и создают предпосылки для проработки подходов к созданию биоимитаторов лигандов специфических для нейротрофиновых рецепторов. Представляется весьма вероятным, что создание эффективных миметиков указанных белковых факторов (как и других регуляторных белков) невозможно без учета подобных функциональных свойств их молекул, выделенных из природных источников. Из сопоставления изложенных данных с результатами, полученными при изучении функциональных свойств других белков регуляторного характера, нами развиты представления о важности собственной энзиматической активности этих белков для «возбуждения» соответствующего белка рецептора [19].

Чрезвычайно большой полиморфизм клеток нервной ткани в морфологическом, функциональном и метаболическом отношении, высокая степень дифференциации ряда клеточных элементов ткани, прежде всего нейронов, обуславливают широкий масштаб фундаментальных и прикладных исследований в двух указанных выше направлениях, которые разрабатываются нашим институтом совместно с другими научными учреждениями.

Литература

1. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Судник Ю. М. // Докл. АН БССР. 1986. Т. 30, № 6. С. 558–560.
2. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. // 18th FEBS Meeting: Abstracts. Ljubljana, 1987. P. 84.
3. Nikandrov V. N. // 14th Intern. Congr. of Biochemistry: Abstracts. Prague, 1988. Vol. 1. P. 60.
4. Никандров В. Н. // Профилактика и лечение инфекционных и паразитарных заболеваний: Материалы юбилейной конф. БелНИИ эпидемиологии и микробиологии. Минск, 1995. С. 274–286.
5. Nikandrov V. N. // Int. J. Biochem. 1992. Vol. 24, N 1. P. 47–53.
6. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук. 2001. № 1. С. 54–60.
7. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. // Cell. Mol. Biology. 2006. Vol. 52, N 4. P. 30–39.
8. Nikandrov V. N., Murashko O. N., Vorobyova G. V. et al. // Lett. in Peptide Sci. 1997. Vol. 4. P. 497–502.
9. Kohsaka Sh., Namanoie M., Nakajima K. // Keio J. Med. 1996. Vol. 45, N 3. P. 263–269.
10. Володкович О. И., Никандров В. Н. // Механизмы функционирования висцеральных систем: Тез. докл. Междунар. конф., посвящ. 75-летию со дня рожд. А. М. Уголева. СПб., 2001. С. 65.
11. Володкович О. И., Никандров В. Н. // Функциональная нейроморфология. Фундаментальные и прикладные аспекты. К 100-летию академика Д. М. Голуба. Минск, 2001. С. 66–69.
12. Baron-Van Evercooren A., Lefrinse P., Rogister B. et al. // Dev. Brain Res. 1987. Vol. 36. P. 101–108.
13. De-Petro G., Soreta A., Barlati S. // Exp. Cell. Res. 1994. Vol. 213. P. 286–294.
14. Dano K, Andreasen P. A., Grondahl-Hansen J. et al. // Adv. Cancer Res. 1985. Vol. 44. P. 139–226.
15. Wolf B. B., Vasudevan J., Henkin J., Gonias S. L. // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268, N 22. P. 16327–16331.
16. Полукошко Е. Ф., Гронская Р. И., Шпак Г. А., Никандров В. Н. // X съезд Белорусского общества физиологов: Тез. докл. Минск, 2001. С. 124–125.
17. Никандров В. Н., Володкович О. И., Гронская Р. И. и др. // Достижения медицинской науки Беларуси. Вып. VII. Минск, 2002. С. 49–50.
18. Жук О. Н., Полукошко Е. Ф., Никандров В. Н. // Механизмы функционирования висцеральных систем: Тез. докл. III Всерос. конф. СПб., 2003. С. 106–107.
19. Полукошко Е. Ф., Пыжова Н. С., Гронская Р. И., Никандров В. Н. // Протеолиз, механизмы его регуляции и роль в физиологии и патологии клетки: Тез. докл. междунар. конф. Минск, 2007. С. 60–61.

20. Жук О. Н., Калюнов В. Н., Никандров В. Н. // Колосовские чтения-2002: Тез. докл. IV Междунар. конф. по функциональной нейроморфологии. СПб., 2002. С. 110.
21. Жук О. Н., Никандров В. Н. // Механизмы функционирования висцеральных систем: Тез. докл. междунар. конф., посвящ. 75-летию со дня рожд. А. М. Уголева. СПб., 2001. С. 129–130.
22. Жук О. Н., Никандров В. Н. // Функциональная нейроморфология. Фундаментальные и прикладные аспекты. К 100-летию академика Д. М. Голуба. Минск, 2001. С. 100–102.
23. Гронская Р. И., Полукошко Е. Ф., Шпак Г. А., Никандров В. Н. // Функциональная нейроморфология. Фундаментальные и прикладные аспекты. К 100-летию академика Д. М. Голуба. Минск, 2001. С. 77–79.
24. Никандров В. Н., Жук О. Н., Полукошко Е. Ф., Пыжова Н. С. Нейрогуморальные механизмы регуляции функций в норме и патологии. Минск, 2007. С. 156–161.
25. Жук О. Н., Никандров В. Н. Пат. ВУ № 8301, 04.04.2006.
26. Романовская А. А. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2006. № 5. С. 158–160.
27. Романовская А. А., Никандров В. Н. // Докл. НАН Беларусі. 2007. Т. 51, № 2. С. 57–60.
28. Романовская А. А., Никандров В. Н. // Цитология. 2007. Т. 49, № 8. С. 656–663.
29. Романовская А. А. Изменения функционально-метаболического состояния клеток нервной ткани под влиянием плазминогена, стрептокиназы и их эквимольных комплексов с пируваткиназой: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Минск, 2007.
30. Гронская Р. И., Никандров В. Н. // Протеолиз, механизмы его регуляции и роль в физиологии и патологии клетки: Тез. докл. Междунар. конф. Минск, 2007. С. 45–47.
31. Шпак Г. А., Гронская Р. И., Никандров В. Н. // Юбилейная конф., посвящ. 50-летию со дня основания Института физиологии Национальной академии наук Беларусі: Тез. докл. Минск, 2003. С. 176–177.
32. Никандров В. Н., Петрусенко Г. П., Гронская Р. И., Тумилович М. К. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук. 2003. № 2. С. 54–57.
33. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук. 2003. № 3. С. 75–89.
34. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S., Lukashevitch V. S. et al. // 18th Intern. Congr. of Biochem. Mol. Biol. Abstract Book. Birmingham, 2000. P. 317.
35. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // Проблемы медицинской энзимологии: Тр. Всерос. конф. М., 2002. С. 163–164.
36. Rajah R., Bhalal A., Nunn St. E. et al. // Endocrinology. 1996. Vol. 137. P. 2676–2682.
37. Rakowicz-Szulczynska E. M., Herlyn M., Koprowski H. // Cancer Res. 1988. Vol. 48. P. 7200–7206.
38. Samagh B. S., Gregory K. F. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. Vol. 273. P. 188–198.
39. Никандров В. Н., Жук О. Н., Гронская Р. И. и др. // Materials, methods and technology: Scientific articles 2007. Bourgas (Bulgaria), 2007. P. 48–66.