

# ВЕСЦІ

## НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК 2008 № 3

# ИЗВЕСТИЯ

## НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК 2008 № 3

ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 2004 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

### ЗМЕСТ

#### КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Гончаров А. Е., Титов Л. П. Иммунобиологический эффект индукторов цАМФ на моноцитарные дендритные клетки человека . . . . .	5
Прохорова В. И., Державец Л. А., Лаппо С. В., Юревич Н. В. Процессы перекисного окисления липидов и защитная роль антиоксидантной системы у больных поверхностным раком мочевого пузыря . . . . .	11
Чернов А. Н., Калюнов В. Н., Кульчицкий В. А. Влияние цементно-асбестовых поллютантов на развитие культуры клеток глиобластомы человека . . . . .	14
Осадчук Т. В., Мосез К. А. Определение и оценка информативности внутрилуксных микросателлитных маркеров для диагностики невральнoй амиотрофии Шарко–Мари–Тус 1А типа . . . . .	18
Ходосовский М. Н. Влияние нитропрусида натрия на прооксидантно-антиоксидантную систему печени при ее ишемии-реперфузии у кроликов . . . . .	23
Романовская А. А., Никандров В. Н. Морфофункциональное состояние клеток глиомы С6 под влиянием эквимолярных комплексов плазминогена с пируваткиназой . . . . .	28
Скрягина Е. М. Иммунофенотипическая характеристика лимфоцитов периферической крови на ранней стадии туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью . . . . .	34
Кравченко Е. В., Жебракова И. В., Тумар Е. М. Влияние острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией на показатели физической выносливости мышей . . . . .	41
Морозова И. Л., Нежута А. Ю., Гапеев А. Б., Бомберова О. В., Улащик В. С. Влияние электромагнитного излучения частотой 35,27 ГГц на температурные и ноцицептивные реакции при воспалительном процессе . . . . .	45
Забавская Т. В., Подольская-Девочко Т. В., Князькина О. Б., Бараш О. Б., Бойко Ю. Н., Матвеева А. В., Фещенко С. П. Полиморфизм гена CTLA-4 при сахарном диабете I типа . . . . .	50

<b>Батуревич Л. В.</b> Показатели липидного и гормонального обмена у женщин детородного возраста с различной массой тела . . . . .	53
<b>Луковская Н. Д., Громыко Н. Л., Барановская Е. И., Маленченко А. Ф.</b> Клиническое значение определения состояния центров связывания сывороточного альбумина при беременности . . . . .	58
<b>Венчикова Н. А.</b> Использование специализированной пренатальной эхокардиографии для диагностики врожденных пороков сердца . . . . .	64
<b>Романовская Т. В., Науменко С. Г., Гринёв В. В.</b> Противолейкозный потенциал комбинаций флавоно-3-ола кверцетина со стандартными цитостатическими лекарственными препаратами. . . . .	71
<b>Гончарова Р. И., Савина Н. В., Смаль М. П., Кужир Т. Д., Политыко А. Д., Егорова Т. М., Хурс О. М.</b> Анализ уровня aberrаций хромосом, эндогенных повреждений ДНК и чувствительности генома к окислительному стрессу в лимфоцитах человека. . . . .	77
<b>Щербина Н. Ю.</b> Влияние ионов магния на перекисное окисление липидов и состояние антиоксидантной системы при ишемии головного мозга. . . . .	85
<b>Горудко И. В., Буко И. В., Черенкевич С. Н.</b> Лектин-индуцированная агрегация тромбоцитов крови больных с острым коронарным синдромом . . . . .	91
<b>Федосенко О. Л.</b> Влияние хронического облучения на состояние сперматогенеза в ряду поколений в эксперименте. . . . .	97
<b>Шанько Ю. Г., Танин А. Л.</b> Методические подходы к хирургическому лечению нетравматических (инсультных) внутримозговых гематом и анализ показателей летальности . . . . .	102

#### **АГЛЯДЫ**

<b>Шилов В. В.</b> Триметазидин. Обзор экспериментальных исследований . . . . .	110
<b>Давыдовский А. Г., Гурманчук И. Е.</b> Комплексная фармакологическая коррекция метаболических нарушений при гипоксических и токсико-септических состояниях . . . . .	115

#### **ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ**

<b>Андрей Георгиевич Мойсеёнок</b> (К 65-летию со дня рождения) . . . . .	121
<b>Владимир Андреевич Кириллов</b> (К 60-летию со дня рождения) . . . . .	122

А. А. РОМАНОВСКАЯ, В. Н. НИКАНДРОВ

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК ГЛИОМЫ С6 ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКВИМОЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПЛАЗМИНОГЕНА С ПИРУВАТКИНАЗОЙ

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

(Поступила в редакцию 08.10.2007)

**Введение.** На молекулярном и клеточном уровнях функциональное состояние клеток нервной ткани контролируется целым рядом регуляторных механизмов, причем вполне вероятно, что регуляторными свойствами в той или иной мере обладает большинство белков. Среди них плазминоген (Пг) – неактивный предшественник сериновой протеиназы. Показано, что микроглия из мозга крысы продуцирует и секретирует активатор Пг [1] и сам Пг [2]. Пг, его активаторы и ингибиторы в ЦНС принимают участие как в патологических, так и в физиологических процессах. Они оказывают воздействие на нейритный вырост [3], повышают выживаемость и участвуют в развитии культивируемых нейронов среднего мозга [4, 5], а посредством модулирования NMDA рецепторов в гиппокампе Пг играет важную роль в процессах синаптической передачи [6].

В 1989 г. на поверхности клеток глиомы С6 были обнаружены рецепторы к Пг [7]. Однако природа их до сих пор не выяснена. Установлено, что Пг поддерживает жизнеспособность клеток глиомы С6 и стимулирует их пролиферацию в бессывороточной среде культивирования [8].

Поскольку Пг присутствует в ткани в пуле других белков, высока вероятность формирования стабильных комплексов Пг–белок. Установлено, что Пг может образовывать такие комплексы с оксидоредуктазами и пируваткиназой (ПК) [9]. Эксперименты, проведенные *in vitro*, показали, что ПК сама по себе может модулировать электрофизиологическую активность понтобульбо-спинальных нейронов и влиять на характер эффектов, вызываемых в этих нейронах Пг [10]. Кроме того, установлено, что ПК ингибирует синтез ДНК и белка в клетках глиомы С6 [11].

Цель работы – исследовать жизнеспособность, содержание нуклеиновых кислот и уровень общего клеточного белка, а также морфологию клеток глиомы С6 под воздействием экзогенного Пг, ПК и их эквимоллярных комплексов.

**Материалы и методы исследования.** Использованы образцы очищенного Пг, полученные из обогащенной β-глобулинами фракции плазмы крови здоровых доноров с помощью аффинной хроматографии на лизин-сефарозе, которые были любезно предоставлены Н. С. Пыжовой (НИИ эпидемиологии и микробиологии, Минск), а также ПК из мышцы кролика (ЕС 2.7.1.40) производства фирмы Reanal (Венгрия), NADH и пируват натрия, приобретенные у Sigma-Aldrich (Sigma, США).

Клетки глиомы С6 получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). В качестве питательной среды использовали DMEM (США) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; NuClone, Бельгия) и 20 мкг/мл гентамицина. Клетки культивировали в 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С и 90% относительной влажности и пересевали по достижении 90% конfluence (каждые 4–5 сут). Посевная плотность составляла (6–8)×10<sup>3</sup> кл/см<sup>2</sup>.

Почти конfluence культуру (>90%) снимали при помощи версена и в 1 мл культуральной среды с 10% ЭТС помещали на пластиковые чашки (Sarstedt, США), создавая плотность 25 000 кл/см<sup>2</sup>. Через 1 сут эту среду заменили свежей с 0,5%-ным содержанием ЭТС, чтобы синхронизировать клетки в клеточном цикле и исключить влияние сывороточных белков. На 3-и сутки в культу-

ральную среду, не содержащую сыворотку крови, вносили предварительно стерилизованные Пг, ПК или их эквимоллярные комплексы в концентрациях  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  М. Результаты эксперимента учитывали через 1 сут, когда появлялись первые признаки морфофункциональных изменений, и через 3 сут, когда они были четко выражены.

Содержание ДНК и РНК определяли, используя принцип фракционирования по Шмидту–Тангаузеру с последующей спектрофотометрией, как описано ранее [8]. Параллельно в пробах спектрофотометрически определяли концентрацию общего клеточного белка, используя разность величин абсорбции образцов при 280 и 260 нм. После подсчета клеток в камере Горяева спустя 1 и 3 сут вычисляли индекс пролиферации (ИП) как отношение конечной концентрации клеток к исходной (посевной). Степень клеточной дегенерации количественно оценивали в ходе измерения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ, ЕС 1.1.1.27) в кондиционированной среде, как описано в [12]. Морфологию культуры клеток изучали при помощи светового инвертированного фазово-контрастного микроскопа OPTON (Германия).

Все результаты представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение не менее трех независимых измерений, выполненных в триплетах. Статистическую значимость полученных результатов оценивали при помощи U-теста для непараметрических выборок. Различия считали значимыми при  $P < 0,05$ . Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0.

**Результаты и их обсуждение.** Так как клетки глиомы С6 в эксперименте выращивали в питательной среде без ЭТС, за время культивирования содержание нуклеиновых кислот и белка в контроле снизилось (рис. 1, а, б), а активность ЛДГ в среде культивирования увеличилась (рис. 2, а, б). Кроме того, при исследовании морфологии клеток в контроле наблюдали дегенеративные изменения – появление в клеточном монослое округлых клеток и снижение их адгезивной способности (рис. 3, а).

Через 1 сут культивирования клеток глиомы С6 с различными ( $10^{-11}$ – $10^{-7}$  М) концентрациями Пг каких-либо изменений в содержании ДНК не наблюдали (данные не представлены). Культивирование с Пг в концентрации  $10^{-9}$ – $10^{-7}$  М вело к увеличению содержания РНК в 1,5–2,1 раза и белка в 1,3–1,5 раза в сравнении с таковыми в контроле, что может свидетельствовать о повышении функциональной активности клеток С6 (см. рис. 1, а). ИП при этом не изменялся. Параллельно наблюдали снижение активности ЛДГ в культуральной среде (рис. 2, а).

Через 3 сут культивирования клеток С6 с Пг отмечали увеличение содержания ДНК, РНК и белка (см. рис. 1, б) в клетках, рост ИП на 120–180% и снижение активности внеклеточной ЛДГ (рис. 2, б), в то время как в контрольных культурах вследствие депривации сыворотки наблюдали противоположные процессы: уровень клеточных макромолекул снижался, а активность внеклеточной ЛДГ увеличивалась. Так, активность ЛДГ в среде культивирования клеток глиомы С6 с  $10^{-7}$  М Пг в этот период была в 10 раз ниже, чем без него (рис. 2, б). Кроме того, Пг препятствовал развитию морфологических изменений, описанных выше (рис. 3, б). Его низкие концентрации ( $10^{-11}$  М) не оказывали каких-либо эффектов на содержание макромолекул, выход ЛДГ и клеточную морфологию.

Через 1 сут культивирования глиомы С6 с ПК не было отмечено изменений в содержании нуклеиновых кислот и белка (см. рис. 1, а), а также в величине ИП. Однако наблюдали увеличение активности внеклеточной ЛДГ приблизительно в 1,4–3,4 раза в сравнении с контролем (рис. 2, а). На 3-и сутки негативное воздействие ПК, особенно в концентрации  $10^{-7}$  М, выражалось в значительном уменьшении по сравнению с контролем содержания ДНК, РНК и белка и снижении ИП (рис. 1, б), а также в увеличении активности ЛДГ в кондиционированных средах (рис. 2, б). Кроме того, наблюдали значительные морфологические изменения дегенеративного характера, которые выражались в появлении пустот в клеточном монослое, формировании конгломератов и наличии большого количества плавающих клеток (рис. 3, в). Меньшие концентрации ПК ( $10^{-11}$ – $10^{-9}$  М) не имели такого сильного токсического действия на глиому С6, и все исследуемые параметры не отличались от контроля (рис. 2, б).

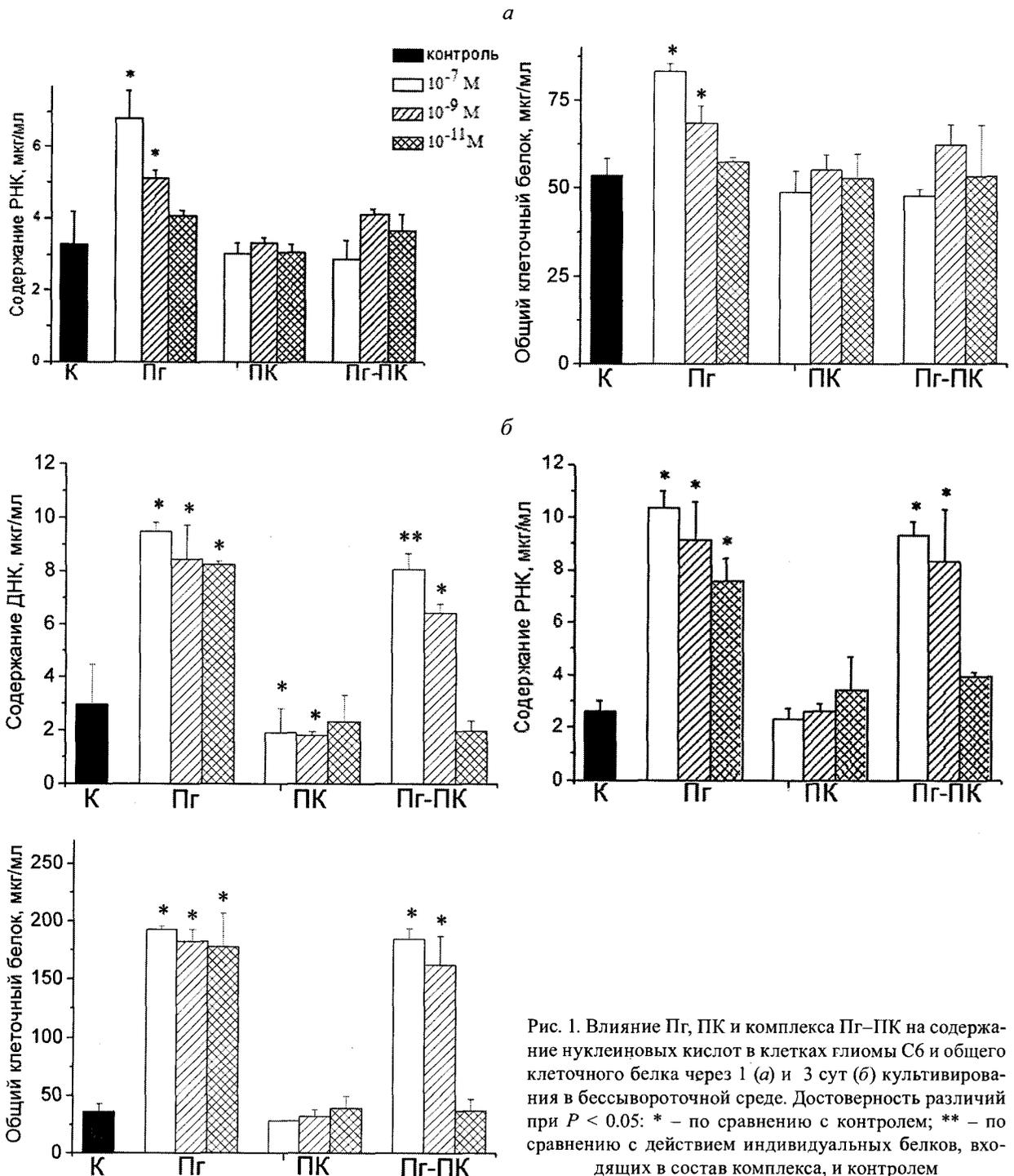


Рис. 1. Влияние Пг, ПК и комплекса Пг-ПК на содержание нуклеиновых кислот в клетках глиомы С6 и общего клеточного белка через 1 (а) и 3 сут (б) культивирования в бессывороточной среде. Достоверность различий при  $P < 0.05$ : \* – по сравнению с контролем; \*\* – по сравнению с действием индивидуальных белков, входящих в состав комплекса, и контролем

Через 1 сут эффект комплекса Пг-ПК напоминал действие ПК на этом же временном промежутке: уровни макромолекул и ИП не изменялись, но активность внеклеточной ЛДГ была в 1,4–3,4 раза выше контрольных показателей.

На 3-и сутки в клетках С6, которые культивировали в присутствии комплекса Пг-ПК в концентрациях  $10^{-9}$ – $10^{-7}$  М, зарегистрирован более высокий уровень нуклеиновых кислот и белка, чем в контроле. Однако содержание ДНК в клетках глиомы С6, выращенных с добавлением  $10^{-7}$  М Пг, было в 1,2 раза выше, чем при воздействии комплекса. Содержание же ДНК в клетках глиомы С6 после культивирования в присутствии комплекса в концентрации  $10^{-11}$  М было сходно с контролем, в то время как Пг даже в такой невысокой концентрации вызывал повышение уровня ДНК. Воздействие комплекса Пг-ПК приводило к увеличению содержания РНК и клеточного

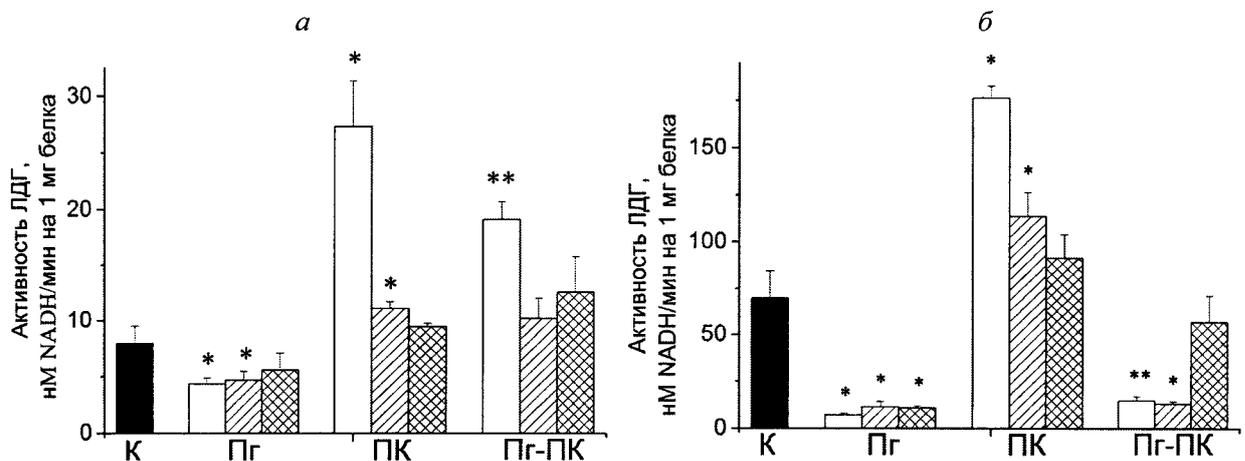


Рис. 2. Активность ЛДГ в кондиционированной среде клеток глиомы С6 через 1 (а) и 3 сут (б) культивирования с Пг, ПК и Пг-ПК. Условные обозначения как на рис. 1

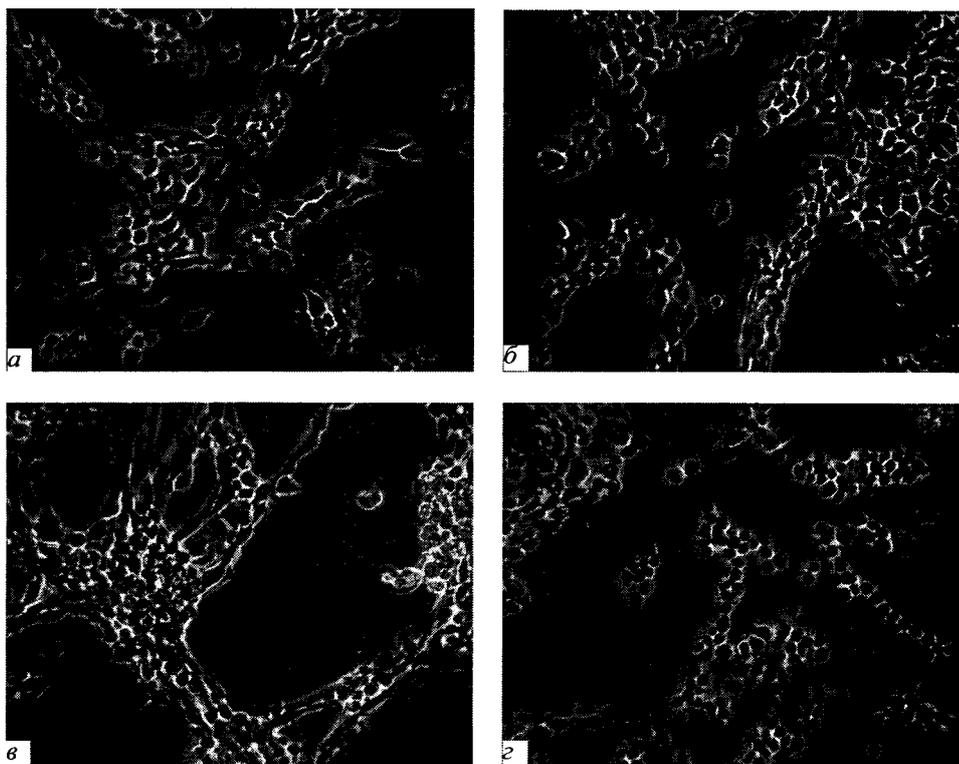


Рис. 3. Микрофотографии глиомы С6 через 3 сут культивирования. Фазовый контраст ( $\times 16$ ). а – контроль; б – клетки, культивируемые с  $10^{-7}$  М Пг; в – с  $10^{-7}$  М ПК; г – с  $10^{-7}$  М комплекса Пг-ПК

белка примерно в той же степени, что и воздействие одного Пг (рис. 1, б). В концентрации  $10^{-7}$  М исследуемый комплекс вызывал увеличение ИП на 120%, а в концентрации  $10^{-9}$  М – на 165%. Концентрация  $10^{-11}$  М не оказывала влияния на пролиферацию клеток.

Активность ЛДГ в среде культивирования глиомы С6 с Пг-ПК была выше, если сравнивать с таковой под действием Пг, но ниже контрольных показателей (рис. 2, б). Таким образом, действие комплекса Пг-ПК напоминало действие Пг, но было несколько отдалено по времени.

Известно, что система Пг-плазмин играет роль в регуляции клеточной пролиферации и миграции в период эмбрионального развития, а также при метастазировании и инвазии опухолей. Ранее показано [13], что Пг участвует в регуляции пролиферации клеток нейробластомы. Наши данные указывают на то, что зимоген также стимулирует пролиферацию клеток глиомы С6 в бессывороточной среде. Уровни ИП, ДНК, РНК и белка возрастали в его присутствии. Мито-

генный эффект Пг может реализовываться через инсулиновый ростовой фактор (Insulin Growth Factor – IGF), а именно через IGF-1, который продуцируется клетками глиомы С6 [14].

Показано также, что Пг вносит вклад в поддержание жизнеспособности клеток глиомы С6 в течение 1–3 сут и предотвращает развитие дегенеративных изменений в этих клетках, маркерами которых служат увеличение активности внеклеточной ЛДГ и изменение морфологии клеток. Ранее установлено, что добавление  $10^{-11}$ – $10^{-6}$  М Пг в бессывороточную среду культивирования феохромоцитомы РС12 снижает гибель клеток на 70–95% [15]. Известно, что клеточная гибель в среде с депривацией ЭТС детерминирована главным образом развитием окислительного стресса, что позволяет предположить наличие у Пг механизмов, предотвращающих формирование или проявление действия свободных радикалов. Это предположение подтверждает тот факт, что Пг способен нивелировать повреждающий эффект перекиси водорода в отношении клеток симпатических ганглиев в культуре [16]. Кроме того, на очищенных образцах Пг было показано, что зимоген обладает супероксидконвергирующей способностью [17]. Таким образом, предполагается, что существует два типа механизмов, благодаря которым Пг способен поддерживать жизнеспособность клеток в бессывороточной среде:

- 1) механизмы, предотвращающие генерирование и накопление активных форм кислорода;
- 2) рецептор-опосредованные механизмы, ведущие к активации антирадикального ответа клеток.

В высокой концентрации ( $10^{-7}$  М) ПК оказывала токсический эффект на клетки глиомы С6, на что указывает снижение ИП, содержания ДНК и белка, а также увеличение активности внеклеточной ЛДГ. И если действие Пг, по-видимому, опосредуется через его специфические рецепторы на поверхности клеток, то механизм действия ПК пока неясен. Ранее получены данные, которые указывают на прямое действие ПК на элементы бульбарного респираторного центра. При суперфузии понтобульбоспинального препарата раствором, содержащим ПК, наблюдали атипичную трансформацию респираторных разрядов, которые принимали форму, напоминающую инспираторную активность нейронов в периоде неонатального развития крыс [10]. Таким образом, нельзя исключить вероятность влияния ПК на некоторые структуры клеточной мембраны и опосредованный через них клеточный ответ.

Влияние комплекса Пг–ПК сходно с действием Пг, т. е. ведет к увеличению пролиферации клеток и их жизнеспособности в условиях отсутствия ЭТС в среде культивирования. Но развитие этого эффекта несколько отдалено по времени, поэтому изменения изучаемых параметров наблюдаются только на 3-и сутки.

Как показано в тесте исследования фибринолитической активности, ПК, связываясь с Пг, не изменяет его биохимических свойств [9]. Это наводит на мысль о том, что в составе эквимольного комплекса ПК может блокировать взаимодействие Пг с его рецепторами. Следует отметить, что длительная перфузия понтобульбоспинального препарата раствором, содержащим Пг, приводила к блокаде респираторной активности нейронов, которая отменялась при добавлении к раствору ПК [10]. Таким образом, в данном случае также имело место ингибирование действия Пг при формировании комплекса с ПК. Тем не менее, вероятно, позднее этот комплекс диссоциирует или изменяет свою конформацию, что дает возможность Пг связаться со своим рецептором и реализовать биологический эффект.

## Выводы

1. Пг в концентрации  $10^{-11}$ – $10^{-7}$  М способствует поддержанию жизнедеятельности культуры глиомы С6 в бессывороточной среде культивирования. Он вызывает стабилизацию цитоплазматических мембран клеток. Добавление в питательную среду для клеток глиомы С6 изучаемого белка замедляет развитие дегенеративных изменений в клеточном пласте, вызванных депривацией сывороточных факторов.

2. Внесение ПК в среду культивирования глиомы С6 оказывает токсическое воздействие на клетки.

3. Пг в комплексе с ПК ослабляет цитотоксическое действие фермента в отношении клеток глиомы С6.

Таким образом, анализ биологического действия комплекса Пг–ПК показал, что ответ клеток глиомы С6 на его введение в среду культивирования отличается от эффектов индивидуальных белков, входящих в состав комплекса.

### Литература

1. Nagata K., Takei K., Nakajima K. et al. // *J. Neurosci. Res.* 1993. Vol. 34. P. 357–363.
2. Nakajima K., Tsuzaki N., Nagata K. et al. // *FEBS.* 1992. Vol. 308. P. 179–182.
3. Krystosek A., Seeds N. W. // *Science.* 1981. Vol. 213. P. 1532–1534.
4. Nagata K., Nakajima K., Kohsaka S. // *Dev. Brain Res.* 1993. Vol. 75. P. 31–37.
5. Nagata K., Nakajima K., Takemoto N. et al. // *Int. J. Dev. Neurosci.* 1993. Vol. 11. P. 227–237.
6. Inoue K., Koizumi S., Nakajima K. et al. // *Neurosci. Lett.* 1994. Vol. 179. P. 87–90.
7. Hall S. W., Vandenberg S. R., Gonias S. L. // *Brain Res.* 1989. Vol. 495. P. 373–376.
8. Романовская А. А. // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* 2006. № 5. С. 158–160.
9. Nikandrov V. N., Murashko O. N., Vorobyova G. V. et al. // *Lett. Pept. Sci.* 1997. Vol. 4. P. 497–502.
10. Никандров В. Н., Пятин В. Ф., Алексеева А. С. и др. // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук.* 2003. № 2. С. 40–43.
11. Романовская А. А. // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* 2005. № 5. С. 38–41.
12. Gorovits R., Avidan N., Shaked I. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. P. 7024–7029.
13. Menouny M., Binoux M., Babajko S. // *Endocrinology.* 1997. Vol. 138. P. 683–690.
14. Lowe W. L. Jr., Meyer T., Karpen C. W. et al. // *Endocrinology.* 1992. Vol. 130. P. 2683–2691.
15. Никандров В. Н., Жук О. Н., Петрусенко Г. П. и др. // *Достижения медицинской науки Беларуси.* 2002. Вып. VII. С. 49–50.
16. Жук О. Н., Полукошко Е. Ф., Никандров В. Н. // *Механизмы функционирования висцеральных систем: Тез. докл. СПб., 2005. С. 174–175.*
17. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук.* 2003. № 3. С. 75–89.