

ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

Выходит шесть номеров в год

Журнал основан в июле 1957 года

МИНСК, БЕЛОРУССКАЯ НАУКА, 2007, ТОМ 51, № 2

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Редакционная коллегия:

М. В. Мясникович (главный редактор),

Н. С. Казак (зам. главного редактора),

С. В. Абламейко, Е. Д. Белоенко, И. М. Богдевич, Н. А. Борисевич, Г. А. Василевич,
П. А. Витязь, И. Д. Вологовский, И. В. Гайшун, В. Г. Гусаков, С. А. Жданок, Н. А. Изобов,
А. А. Коваленя, Ф. Ф. Комаров, Н. П. Крутько, В. А. Лабунов, Ф. А. Лахвич, О. Н. Левко,
А. И. Лесникович, В. Ф. Логинов, М. М. Маханек, А. А. Махнач, А. А. Михалевич,
П. Г. Никитенко, Ю. М. Плескачевский, В. И. Семенов, А. Ф. Смянович,
В. И. Тимошпольский, Л. М. Томильчик, Л. В. Хотылева, А. Л. Худолей, И. П. Шейко,
Т. М. Амосова (ведущий редактор)

Адрес редакции:

220072, Минск, пр. Независимости, 66, к. 404,
т. 284-19-19

<http://nasb.gov.by/rus/publications/dan/>

E-mail: belnauka@infonet.by

СОДЕРЖАНИЕ

МАТЕМАТИКА

Давьялова Е. В., Зверович Э. И. Замкнутое решение частного случая четырехэлементной задачи Маркушевича	5
Орлович Ю. Л., Гордон В. С., Зверович И. Э., Финке Г. Сложность аппроксимации задачи наименьшего (наибольшего) максимального индуцированного паросочетания в графе	11
Васильев И. Л., Рулинский Ю. Г. Об одном условии представимости целых функций конечной степени интегралами Фурье от функций из L_p	17
Радыно А. Я., Сендер А. Н. p -Адические сплайны как аппарат приближения Q_p -значных функций	21
Гайшун И. В., Горячкин В. В. Матричный бином и его применение к двухпараметрическим дискретным системам	26
Величко М. В., Супруненко И. Д. Малые унипотентные элементы в представлениях специальной линейной группы с большими старшими весами	29

ФИЗИКА

Томильчик Л. М., Молчан М. А. Осциллятор Дирака как феноменологическая модель конфайнмента кварков	34
Мильчанин О. В., Комаров Ф. Ф., Плебанович В. И., Гайдук П. И., Комаров А. Ф. Улучшение параметров мелких p^+ - n -переходов в кремнии путем дополнительных имплантаций ионов углерода и ступенчатых термообработок	40

ХИМИЯ

Поткин В. И., Петкевич С. К., Азарко В. А., Кабердин Р. В. Удобный метод построения 1,3-тиазинового и 1,3-тиазольного гетероциклов на основе 1,1,4,4-тетрахлор-1-бутен-3-она	46
Скорб Е. В., Устинович Е. А., Свиридов Д. В. Фотокаталитически-активные композитные покрытия на основе диоксида титана	49
Солдатов В. С., Зеленковский В. М., Безъязычная Т. В., Мосунова Н. В., Сосинович З. И. Сорбция ионов меди полимерным сорбентом, содержащим амидо-полиаминовые группы	53

БИОЛОГИЯ

Романовская А. А., Никандров В. Н. Плазминоген и стрептокиназа в регуляции пролиферации клеток глиомы С6 и нейробластомы IMR-32	57
Игнатовец О. С., Ахрамович Т. И., Феськова Е. В., Леонтьев В. Н. Механизм деградации симазина бактериями рода <i>Pseudomonas</i>	61
Козлова Н. М., Гармаза Ю. М., Кутько А. Г., Зубрицкая Г. П., Слобожанина Е. И. Влияние детергентов на транспорт конъюгатов глутатиона из эритроцитов человека	65

МЕДИЦИНА

Белугин С. Н. Изменения мембранного потенциала и возбудимости меченых DiA нейронов из NTS при ренальной гипертензии	68
Белоенко Е. Д., Чернякова Ю. М., Пинчук Л. С. Трибологическое обоснование метода хондропротекции с помощью аутосыворотки крови и гиалуронатов	72

НАУКИ О ЗЕМЛЕ

Конищев В. С. Водорастворенные газы осадочных бассейнов Беларуси и их нефтегазоносность	76
---	----

ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

Рудницкий В. А., Крень А. П., Мозгалев В. В. Соотношение между статическим и динамическим модулем упругости эластомеров	81
Пряхин С. С., Семашко В. И. Кинетика нагрева и охлаждения поверхности паяных соединений при лазерной диагностике	85
Высоцкий М. С., Дубовик Д. А. Коэффициент полезного действия ходовых систем колесных машин	91
Витязь П. А., Хейфец М. Л. Анализ метастабильных и неравновесных процессов по диаграммам состояния при синтезе сверхтвердых материалов	95
Бура А. И., Козлов Г. В., Свириденко А. И. Структурные аспекты процесса текучести композитов на основе фенилона, наполненных короткими волокнами	100
Константинов В. М. Ускоренная диффузия легирующих элементов в железе при химико-термической обработке порошков во вращающемся контейнере	103

СОЦИАЛЬНО-ГУМАНИТАРНЫЕ НАУКИ

Хоряк А. П. Каменное восточнохристианское храмостроительство на Западных землях Беларуси в первой трети ХУІ в.	108
---	-----

АГРАРНЫЕ НАУКИ

Танана Л. А., Амельченко С. Л., Пешко В. В. Племенная ценность быков-производителей Белорусской черно-пестрой породы	113
Долматов Д. А., Прищепа И. А. Пути снижения инвазионной нагрузки и вредноносности галловых нематод в закрытом грунте	118

А. А. РОМАНОВСКАЯ, В. Н. НИКАНДРОВ

ПЛАЗМИНОГЕН И СТРЕПТОКИНАЗА В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ГЛИОМЫ С6 И НЕЙРОБЛАСТОМЫ IMR-32

(Представлено академиком Е. Д. Белоенко)

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

Поступило 05.07.2006

Введение. В последние годы стало очевидно, что экстраклеточные протеазы, в особенности те, которые входят в систему плазминоген-активаторы плазминогена (Пг), принимают участие не только в протеолизе белков внеклеточного пространства, но и оказывают влияние на функции клеток, их рост, дифференцировку и пролиферацию [1]. В процессе развития нервной системы происходит увеличение продукции активаторов Пг, причем их высвобождения клетками нервной ткани регулируется митогенными стимулами. Увеличение пролиферации клеток наблюдается даже в отсутствие Пг, что указывает на то, что в развивающейся нервной системе субстратом для активаторов Пг служит не только Пг [2, 3]. Помимо этого, система Пг и его активаторов принимает участие в онкогенезе [4]. Считается, что протеазы облегчают инвазию и метастазирование опухолей. К примеру, при помощи одного из активаторов Пг – урокиназы запускается молекулярный каскад, ведущий к активации Пг и коллагеназ, что позволяет малигнизированным клеткам мигрировать через экстраклеточный матрикс [5]. Установлена корреляция между агрессивным фенотипом опухоли и секрецией ею активаторов Пг [6]. Стрептокиназа (СК) является продуктом жизнедеятельности представителя микрофлоры человека и животных β -гемолитического стрептококка групп А, С и G и сильнейшим активатором Пг по «непротеиназному» пути. Однако свойства и эффекты данного белка изучены недостаточно.

Цель настоящей работы – провести анализ воздействия Пг и его активатора СК на пролиферацию опухолевых клеток нервной системы человека и животных.

Материалы и методы исследования. Культуры клеток крысиной глиомы С6 и нейробластомы человека IMR-32 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН) поддерживали регулярным пассированием на питательной среде DMEM (Sigma, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Бельгия) и 10 мкг/мл гентамицина. Посевы инкубировали в CO_2 -инкубаторе с 5%-ным содержанием CO_2 при температуре 37 °С. Наблюдение за перевиваемыми культурами осуществляли через 1 сутки, когда появляются первые признаки морфофункциональных изменений, и через 3 суток, когда они достаточно хорошо выражены. 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 в 1 мл питательной среды с 10%-ным содержанием эмбриональной телячьей сыворотки. Предварительно было установлено, что такая плотность посева наиболее оптимальна для работы с данными культурами, и клетки находятся в фазе постоянного роста во время проведения эксперимента. На следующие сутки клетки переводили на среду, содержащую 0,5% телячьей сыворотки, с целью синхронизировать популяцию в клеточном цикле и минимизировать влияние ростовых факторов и питательных веществ, содержащихся в сыворотке. Через 24 ч после этого вносили Пг (НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ) и СК (ОАО «Белмедпрепараты», Беларусь), растворенные в бессывороточной среде, в концентрациях 10^{-7} , 10^{-9} и 10^{-11} М и стерилизованные путем пропускания через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

В основе определения содержания нуклеиновых кислот лежит фракционирование по Шмидту и Тангаузеру, которое сводится к последовательному удалению кислоторастворимой фракции липидов, выявлению и определению с помощью щелочного и кислотного гидролизом нуклеиновых кислот и белка при помощи двухволновой (260/280) спектрофотометрии [7]. Анализ содержания нуклеиновых кислот и белка проводили на спектрофотометре CARY-100 (Varian, Австралия). Обсчет результатов производили в приложении RNA/DNA к программному обеспечению Cary Win UV. Параллельно вели подсчет клеток в гемоцитометре.

Все результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение не менее 3 независимых измерений, выполненных в триплетах. Статистическую значимость полученных результатов определяли по критерию Манна-Уитни для непараметрических выборок, различия считали значимыми при $p < 0,05$. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета STATISTICA 6.0.

Результаты и их обсуждение. Анализ содержания нуклеиновых кислот и белка через 1 сутки инкубации глиомы С6 с Пг в концентрации 10^{-7} – 10^{-9} М показал, что в клетках на 60–100% увеличилось количество РНК, и на 30–50% – белка, в то время как содержание ДНК осталось на уровне контрольных значений. Для клеток нейробластомы IMR-32 наблюдалась сходная тенденция: содержание РНК выросло на 40–50%, белка – на 30–50%, а уровень ДНК остался без изменений (табл. 1).

Таблица 1. Влияние плазминогена и стрептокиназы на содержание макромолекул в клетках глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 после 24 ч инкубации

Концентрация агента влияния	Глиома С6			Нейробластома IMR-32		
	ДНК, мкг/мл	РНК, мкг/мл	Белок, мкг/мл	ДНК, мкг/мл	РНК, мкг/мл	Белок, мкг/мл
Контроль	1,83 \pm 0,4	3,29 \pm 0,88	53,51 \pm 4,84	3,25 \pm 0,7	4,3 \pm 0,32	64,72 \pm 6,79
<i>Плазминоген</i>						
10^{-7} М	2,18 \pm 0,21	6,82 \pm 0,77*	83,31 \pm 2,18*	4,43 \pm 0,58	5,93 \pm 0,56*	82,08 \pm 2,58*
10^{-9} М	2,29 \pm 0,12	5,14 \pm 0,19*	68,42 \pm 4,94*	3,65 \pm 0,61	6,69 \pm 0,76*	96,65 \pm 10,25*
10^{-11} М	2,16 \pm 0,32	4,08 \pm 0,13	57,28 \pm 1,27	3,94 \pm 0,56	5,24 \pm 0,61	80,65 \pm 4,62*
<i>Стрептокиназа</i>						
10^{-7} М	3,88 \pm 0,17*	6,62 \pm 0,5*	89,79 \pm 6,08*	4,53 \pm 0,46*	5,64 \pm 0,09*	93,56 \pm 3,94*
10^{-9} М	2,94 \pm 0,47*	5,02 \pm 0,63*	71,19 \pm 0,3*	4,37 \pm 0,25*	5,33 \pm 0,37*	92,9 \pm 4,72*
10^{-11} М	2,79 \pm 0,73	4,85 \pm 0,71	68,53 \pm 10,42	3,89 \pm 0,5	5,5 \pm 1,03	87,97 \pm 3,54*

Примечание. Различие статистически достоверно ($p < 0,05$)*.

Различий по количеству клеток между культурами, обработанными Пг, и интактными не было выявлено (табл. 2). Этот факт указывает на то, что Пг в 1-е сутки инкубации усиливает биосинтетические процессы, проходящие в клетках, но не влияет на пролиферацию. СК в концентрациях 10^{-7} – 10^{-9} М оказывала явный митогенный эффект на обе культуры, что выражалось в увеличении числа клеток, а также в росте содержания ДНК, РНК и белка. Так, через 24 ч инкубации количество клеток глиомы С6 выросло на 146–148%, ДНК и РНК – на 60–110%, белка – на 30–70%. Число клеток нейробластомы увеличилось на 26–58%, уровень РНК вырос на 20–30%, ДНК – на 34–40%, белка – на 40%. При действии исследуемых белков в концентрации 10^{-11} М их эффект на пролиферацию либо дифференцировку клеток не был установлен (за исключением влияния СК на глиому С6) (см. табл. 1, 2).

К 3-м суткам инкубации в контрольных культурах наблюдали развитие дегенеративных изменений, которые морфологически проявлялись в возникновении очагов обособленных округлых клеток, большая часть которых утратила характерную отростчатость и адгезию к пластику. Развитие всех этих изменений было связано с депривацией сыворотки, которая является для культуры источником факторов роста и других белков, необходимых для нормального развития и функционирования клеток. Содержание макромолекул в этом случае не изменялось либо несколько уменьшалось по сравнению с 1-ми сутками инкубации.

Т а б л и ц а 2. Влияние плазминогена и стрептокиназы на количество клеток глиомы С6 и нейробластомы IMR-32

Концентрация исследуемого агента	Глиома С6		Нейробластома IMR-32	
	1 сутки	3 суток	1 сутки	3 суток
Контроль	567 500±192 000	575 000±25 000	625 000±145 700	598 000±89 500
<i>Плазминоген</i>				
10 ⁷ М	625 000±50 000	1 633 300±166 400*	790 000±123 000	945 300±123 400*
10 ⁹ М	730 000±108 160	1 583 000±101 000*	650 000±76 400	1 050 000±89 700*
10 ¹¹ М	587 000±145 000	1 241 600±286 590*	595 000±49 500	846 780±132 400*
<i>Стрептокиназа</i>				
10 ⁷ М	1 408 330±128 290*	2 700 000±360 555**	985 400±98 600*	1 400 000±108 000**
10 ⁹ М	1 397 000±300 544*	2 383 000±382 760**	787 600±76 500*	967 000±87 500*
10 ¹¹ М	1 275 000±350 000*	1 900 000±265 000**	615 875±84 300	865 700±115 700*

П р и м е ч а н и е. Различие с контролем статистически достоверно ($p < 0,05$)*. Различие между группой культур, на которую влияли Пг и группой, на которую влияли СК достоверно ($p < 0,05$)**.

При добавлении в среду культивирования глиомы С6 Пг во всех исследуемых концентрациях наблюдалось увеличение числа клеток на 115–175%, содержания ДНК – на 175–220%, РНК – на 190–295% и белка – на 390–430% в сравнении с контролем. Стимулирующее влияние Пг также было отмечено в отношении культуры нейробластомы: число клеток было выше контрольных значений на 41–58%, уровень РНК – на 70–130%, ДНК – на 40–60% и белка – на 40–65%. Как видно из приведенных данных, митогенный эффект Пг сильнее появлялся в отношении клеток глиомы, чем в отношении нейробластомы (табл. 2, 3).

Т а б л и ц а 3. Влияние плазминогена и стрептокиназы на содержание макромолекул в клетках глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 через 3 суток инкубации

Концентрация агента влияния	Глиома С6			Нейробластома IMR-32		
	ДНК, мкг/мл	РНК, мкг/мл	Белок, мкг/мл	ДНК, мкг/мл	РНК, мкг/мл	Белок, мкг/мл
Контроль	2,96±1,5	2,6±0,4	36,26±6,8	3,37±0,2	2,87±0,11	56,4±3,25
<i>Плазминоген</i>						
10 ⁷ М	9,48±0,3*	10,33±0,7*	192,68±2,68*	4,74±0,97*	6,25±1,07*	92,55±9,6*
10 ⁹ М	8,4±3,28*	9,16±1,45*	182,25±10,2*	5,42±1,57*	6,55±1,66*	105,9±26,95*
10 ¹¹ М	8,2±0,13*	7,59±0,88*	177,55±79,1*	4,09±0,86	4,91±0,38*	78,05±10,36*
<i>Стрептокиназа</i>						
10 ⁷ М	11,8±3,5*	15,4±3,17**	282,8±68,6**	9,62±1,07**	5,47±1,22*	138,42±15,5**
10 ⁹ М	10,9±2,2*	12,62±1,6**	238,98±53,8*	5,75±0,67*	4,06±1,02*	90,57±5,01*
10 ¹¹ М	8,6±0,59	9,82±0,74**	202,82±28,4*	4,74 ± 0,69*	3,07±0,11	86,06±6,08*

См. примечание к табл. 2.

СК, подобно Пг, во всех концентрациях поддерживала жизнедеятельность клеток в культуре и стимулировала их пролиферацию. Так, добавка СК в среду инкубирования глиомы С6 на 3-и сутки культивирования вела к увеличению концентрации клеток на 230–369%, содержания ДНК – на 190–300%, РНК – на 390–490% и белка – на 460–680% в сравнении с контрольными значениями. При влиянии СК на клетки нейробластомы в зависимости от концентрации наблюдали увеличение числа клеток на 45–134%, концентрации ДНК – на 40–185%, РНК – на 40–90% и белка – на 50–145%. Стимулирующее влияние СК было выражено сильнее, чем действие Пг, на что указывает более высокая пролиферативная активность клеток и высокое содержание макромолекул в них. Стимулирующее действие СК также сильнее проявлялось в отношении клеток глиомы, чем в отношении нейробластомы (табл. 3).

Таким образом, в данном исследовании установлено, что СК при внесении ее в синтетическую питательную среду в концентрации 10⁻⁷–10⁻¹¹ М стимулирует пролиферацию (на что указы-

вает увеличение количества клеток и рост содержания ДНК), начиная с 1-х суток и на протяжении всего времени наблюдения. Этот эффект СК характеризуется прямой зависимостью от вносимой концентрации белка. Хотя через 24 ч культивирования не обнаружено влияния Пг на пролиферацию клеток, через 3 суток, когда в контроле деление клеток прекращается, Пг способствует поддержанию жизнедеятельности клеток в бессывороточной среде. Такое действие Пг опосредуется, по всей видимости, через специфические рецепторы на поверхности клеток. Установлено, что клетки нейробластомы экспрессируют амфотерин, а Пг может формировать комплекс с амфотерином посредством лизин-связывающих сайтов, что вызывает ускорение его активации [8]. Природа же рецепторов к Пг на клетках глиомы С6 до сих пор не установлена.

Выяснение механизма действия СК требует дальнейших исследований. Ранее в нашей лаборатории были получены данные [9, 10], позволяющие отнести СК к классу регуляторных белков, поскольку она в состоянии регулировать жизнедеятельность клеток нервной ткани непосредственно, минуя кровоток. Действие СК направлено на стабилизацию функций клеток и увеличение их выживаемости в неблагоприятных условиях (например, в условиях дефицита сывороточных белков). Стимулирующее действие СК (как, впрочем, и Пг) более выражено в отношении глиальных клеток, нежели нейрональных. Однако, по всей видимости, данный эффект имеет временные ограничения, так как продолжительное действие этого белка ведет к явным деструктивным изменениям клеток, которым в большей мере подвержены астроциты [10].

Заключение. Результаты данного исследования показывают значимость роли Пг и его активатора СК в регуляции процессов пролиферации опухолевых клеток нервной системы человека и животных. Даже в условиях дефицита сывороточных белков компоненты системы экстраклеточного протеолиза стимулируют деление клеток и поддерживают их жизнеспособность в течение довольно длительного времени инкубации. Пролиферация опухолевых клеток может запускаться через сигнальный путь с вовлечением протоонкогенов семейства Мус, активация которых индуцирует вступление клеток в клеточный цикл даже в условиях дефицита факторов роста [11]. Таким образом, роль Пг и его активаторов в опухолевой прогрессии, по-видимому, состоит не только в разрушении экстраклеточного матрикса и облегчении метастазирования и инвазии опухолей, но и, вероятно, в том, что данные агенты могут запускать внутриклеточные каскады реакций, ответственные за неконтролируемую клеточную пролиферацию.

Работа выполнена при поддержке гранта для аспирантов Президиума НАН Беларуси (грант 2006324).

Литература

1. Kohsaka S., Hamaouie M., Nakajima K. // *Keio J. Med.* 1996. Vol. 45. P. 263–269.
2. Calderon N. // *J. Neurosci. Res.* 1982. Vol. 8, N 1-2. P. 509–519.
3. Baron-VanEvercooren A., Leprince P., Rogister B. et al. // *Brain Res.* 1987. Vol. 433, N 1. P. 101–108.
4. Gao C. F., Xie Q., Su Y. L. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. Vol. 102, N 30. P. 10528–10533.
5. Bernstein L. J., Tonn J. C., Goldbrunner R. H. et al. // *Anticancer Res.* 1998. Vol. 18, N 4A. P. 2583–2590.
6. Desruisseau S., Chazarossian-Ragni E., Chinot O., Martin P. M. // *Int. J. Cancer.* 1996. Vol. 66, N 6. P. 796–801.
7. Трудолюбова М. Г. // *Современные методы в биохимии* / Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1977. С. 313–316.
8. Parkkinen J., Rauvala H. // *J Biol Chem.* 1991. Vol. 266, N 25. P. 16730–16735.
9. Никандров В. Н., Петрусенко Г. П., Жук О. Н. и др. // *Достиж. мед. науки Беларуси.* 2002. Вып. VII. С. 49–50.
10. Никандров В. Н., Жук О. Н. // *Морфология.* 2005. Т. 128, № 5. С. 33–36.
11. Amati B., Alevizopoulos K., Vlach J. // *Front. Biosci.* 1998. Vol. 3. P. d250–268.