

MATERIALS, METHODS AND TECHNOLOGY



SCIENTIFIC ARTICLES 2007

*www.ScienceBg.Net
www.eJournalNet.com*

ISBN 978-954-9368-24-6



Published by

Science Invest LTD – branch Bourgas, Bulgaria

- A Company of Union of Scientists in Bulgaria -

2007, Bulgaria

**The scientific articles
in the publication have been edited by:**

Advisory Editor

Mazhar Unsal, Turkey

Editorial Board

Konstantin Logachev, Russia

Cenko Cenkov, Bulgaria

Azat Vildanov, Russia

Violeta Petkova, Bulgaria

The publication has been composed by: Ivan Genov

The authors of the articles bear the responsibility for their content.

When quoting the articles their author and edition should be mentioned.

It is not allowed the edition of the scientific articles to be copied,
multiplied and distributed with the purpose of trade without the permission of the editor.

ISBN 978-954-9368-24-6

**ПРОБЛЕМЫ БИОТЕХНОЛОГИИ КЛЕТОК НЕРВНОЙ ТКАНИ:
ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ ФАКТОРОВ ТРОФИЧЕСКОГО ХАРАКТЕРА**

Виталий Н. Никандров, Ольга Н. Жук, Раиса И. Гронская, Елена Ф. Полукошко,
Нелли С. Пыжова, Галина П. Петрусенко, Алеся А. Романовская

Институт физиологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 28 Минск 220072 БЕЛАРУСЬ

**THE PROBLEMS OF BIOTECHNOLOGY OF NERVOUS TISSUE CELLS:
THE RESEARCH OF THE PROTEIN FACTORS OF TROPHIC CHARACTER**

Vitaly N. Nikandrov, Olga N. Zhuk, Raisa I. Gronskaya, Helena F. Polukoshko,
Nelly S. Pyzhova, Halina P. Petrusenko, Alesya A. Romanovskaya

Institute of Physiology of NAS of Belarus, Akademicheskaya str. 28, Minsk 220072 BELARUS

Abstract.

The results of own researches of a role of plasminogen, streptokinase, Cu, Zn-superoxide dismutase and pyruvate kinase in vital activity of nervous tissue cells at organotypic and dissociated cultures of sympathetic and sensory ganglia, neocortex, and also at transplanted lines of glioma C6, pheochromocytoma PC 12 and neuroblastoma IMR-32 are generalized. The neurotrophic role of the proteins, protective effect of plasminogen in 10^{-10} - 10^{-7} M concentration on the cells of sympathetic ganglia, neocortex and transplanted cultures under the damaging effect of H_2O_2 , glutamate, cold stress were demonstrated. The early unknown properties of oligomer of nerve growth factor and its three subunits were established: the participation in the proteolytic processes (plasminogen-activating and direct proteolytic activity), generating and transformation of active oxygen species, first of all, superoxide radical, endonuclease (DNA-ase and RNA-ase) activity. These facts allow to revise the mechanisms of biological effect of nerve growth factor and create preconditions for elaboration of approaches to creation of a ligand bio-imitators of the neurotrophin-specific receptors.

Key words: *nervous tissue cells, vital activity, ultrastructure, proliferation, regulatory proteins, plasminogen, streptokinase, superoxide dismutase, pyruvate kinase, nerve growth factor, functional properties of protein molecule, mimetics*

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

Применительно к данным высокодифференцированным тканям особенно важным является обеспечение масштабной технологии факторами трофической поддержки, без которых невозможно достичь получения высокопродуктивных жизнеспособных культур и устранения действия повреждающих факторов.

Для роста и дифференциации клеток нервной ткани особое значение имеет ряд белковых факторов, включающих фактор роста эпидермиса - EGF (6 кДа), фактор роста нервов - NGF, продуцируемый головным мозгом фактор - BDNF, CNTF, продуцируемый глией фактор - GDNF, нейротрофины: NT-3, NT-4 (13,6-28,0 кДа). Однако эти белки чрезвычайно дороги. Это создает ряд трудно разрешимых 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 трофинов.

1. ИЗЫСКАНИЕ НОВЫХ БЕЛКОВ РЕГУЛЯТОРНОГО ТИПА, ОБЛАДАЮЩИХ ТРОФИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ НА КЛЕТКИ НЕРВНОЙ ТКАНИ

Опираясь на изложенное в наших работах 1984-2004 представления о механизмах регуляции протеолиза (в частности, концепцию кислородзависимого пути активации плазминогена [1-7]), с 1999 года нами развернут комплекс исследований роли компонентов периделлюлярного протеолиза – плазминогена (Pg) и стрептокиназы (SK) в жизнедеятельности клеток нервной ткани на органных и диссоциированных культурах симпатических (краниального шейного, шейно-грудного), чувствительных (спинальных) ганглиев, неокортекса и мозжечка, на перевиваемых линиях глиомы С6 и феохромоцитомы РС12, нейробластомы IMR-32, а также культурах клеток миокарда новорожденных крыс.

Учитывая обнаруженную способность указанных белков образовывать устойчивые эквимольные комплексы с энзимами углеводно-энергетического метаболизма [8,9], в частности с пируваткиназой (PK), нами изучено действие и этого белка в указанном аспекте.

В настоящей статье изложено обобщение собственных экспериментальных исследований действия Pg, SK и PK на жизнедеятельность клеток нервной ткани в органотипических, диссоциированных и перевиваемых культурах.

1.1 Плазминоген

Pg – гликопротеин сложной доменной структуры мол. массой 72-90 кДа. Под влиянием активаторов он превращается в плазмин – сериновую трипсиноподобную гидролазу. Компоненты системы Pg-плазмин обнаружены в разнообразных клетках, почти во всех жидкостях организма и ее роль 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 определены плазминоген и его мРНК. Однако значение Pg для нервной системы далеко от полной ясности.

На органоной культуре симпатических нейронов взрослых крыс показано [10], что суточная экспозиция с глутаматом (100 мкМ) эксплантатов краниальных шейных ганглиев приводила к развитию в нейронах деструктивных изменений, протекающих по некротическому, и по апоптотическому типу (рис. 1). Выражением первых служили расширение цистерн эндоплазматического ретикулума, набухание митохондрий, вакуолизация нейроплазмы и нарушение целостности наружной мембраны. Свидетельством вторых являлись неправильная форма ядер; конденсация хроматина у внутренних мембран их; эктопия и исчезновение ядрышек; осмиофилия ядер и цитоплазмы с появлением перинуклеарных участков просветления, которые отделяют указанные структуры друг от друга; формирование патологических мембранных комплексов митохондрий; обилие электронноплотных включений типа лизосом и др. Совместное воздействие глутамата и Pg (10 мкг/мл; 10^{-7} М) сопровождалось практически полным исключением некротических изменений при сохранении явлений апоптоза. В этом заключалось отличие эффекта Pg от NGF, совместное воздействие которого с глутаматом вело к заметному ослаблению и апоптотического компонента: структура основной массы нейронов сохранена, нарастала общая численность сохраняющих структуру митохондрий от крупных до новообразуемых мелких. Это может свидетельствовать об активации энергетического метаболизма симпатических. Не менее демонстративным явилось защитное действие зимогена при деструкции клеток краниального шейного ганглия, вызванной 0,0001 М H_2O_2 (рис.1).

На перевиваемых клетках культуры глиомы С6 было показано, что через 24 ч культивирования глиомы С6 в бессывороточной среде жизнеспособность клеток была на уровне 95–98%. Через 3

сут культивирования регистрировали уменьшение жизнеспособных клеток до $13 \pm 1,5\%$. Рg во всех исследуемых концентрациях (10^{-7} - 10^{-11} М) способствовал сохранению исхо-

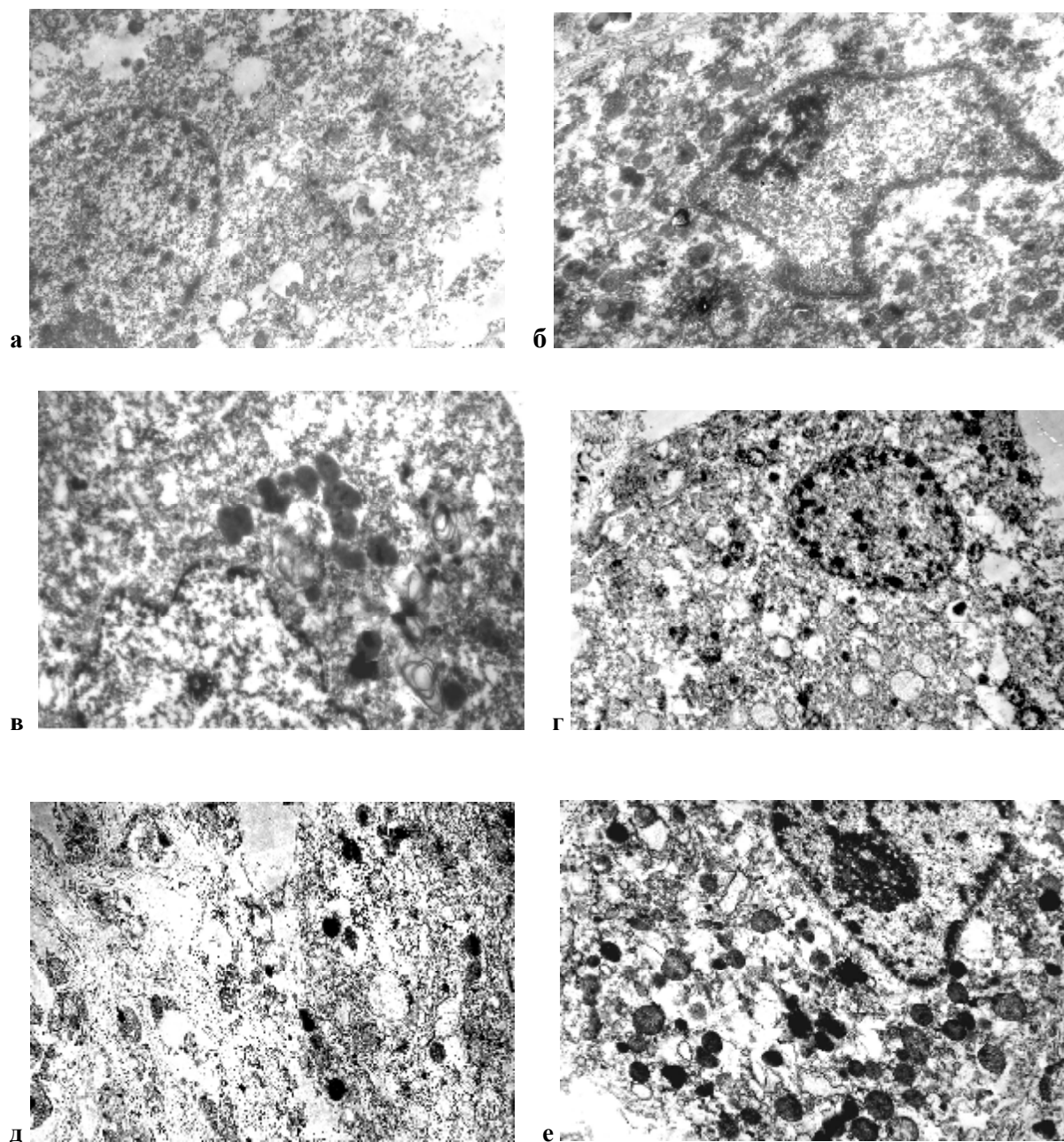


Рис.1. Совместное с глутаматом и пероксидом водорода влияние плазминогена на ультраструктуру симпатических нейронов. Органная культура краниального шейного ганглия взрослой крысы. Питательная среда DMEM + 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки, 24 часа *in vitro*. **а** – глутамат (100 мкМ), деструктивные изменения нейрона по некротическому типу. Ув.8000. **б** – глутамат (100 мкМ), деструктивные изменения нейрона по апоптотическому типу. Ув.6000. **в** – глутамат (100 мкМ) + плазминоген (10 мкг/мл), деструктивные изменения нейрона по апоптотическому типу. Ув.6000. **г** – глутамат (100 мкМ) + 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 мкг/мл), сохранность основных структурных компонентов нейрона. Ув.5000 [10, 12].

дно уровня жизнеспособных клеток [11].

Сходная тенденция наблюдалась и в случае культивирования клеток другой перевиваемой линии - нейробластомы IMR-32. Через 3 сут экспозиции этих клеток в питательной среде, содержащей 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки (ТС) число мертвых клеток в контроле составило $65 \pm 0,9\%$, тогда как при добавке Pg жизнеспособность клеток IMR-32 не уменьшалась [12].

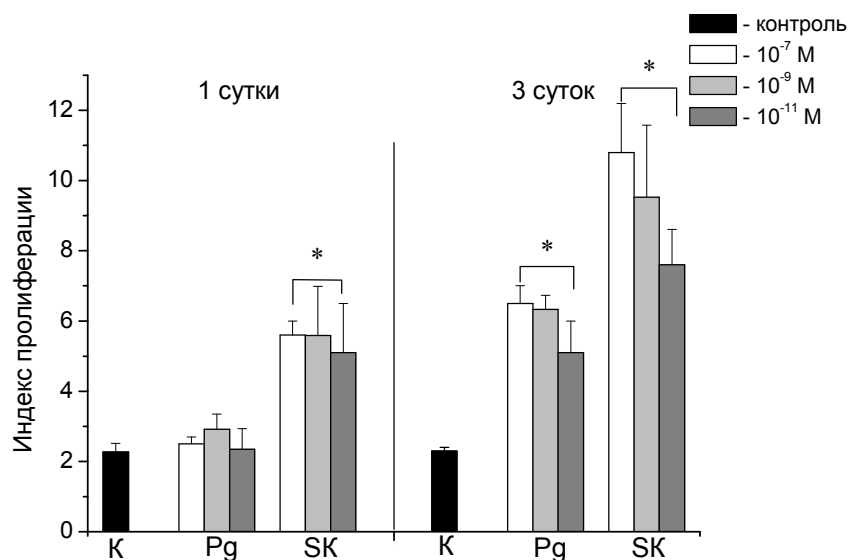


Рис. 2. Изменения величины индекса пролиферации при культивировании глиомы С6 в бессывороточной среде с добавлением плазминогена (Pg) и стрептокиназы (SK). К – контроль, * - $P < 0.05$ [13].

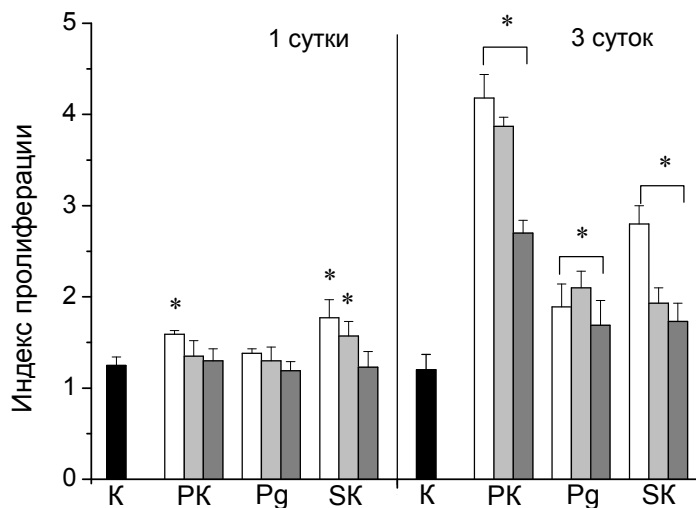


Рис. 3. Изменения величины индекса пролиферации при культивировании нейробластомы IMR-32 в бессывороточной среде с добавлением пируваткиназы (PK), плазминогена (Pg) и стрептокиназы (SK) [13]. Обозначения те же, что в рис. 2.

Итак, через 3 суток, когда в контроле деление клеток глиомы и нейробластомы прекращается, P_g способствовал поддержанию жизнедеятельности клеток в бессывороточной среде. Действие зимогена на клетки С6 во всех исследуемых концентрациях вело к увеличению индекса пролиферации (ИП) на 116-184% (рис. 2). ИП нейробластомы IMR-32 при культивировании с P_g увеличивался на третьи сутки на 48-51% (рис. 3). Под действием P_g через 24 ч культивирования наблюдали увеличение содержания РНК и белка в клетках глиомы С6 и нейробластомы IMR-32, а через 72 ч зарегистрировали и увеличение концентрации ДНК по отношению к контролю (табл. 1, 2).

Стимулирующий эффект P_g при внесении их в среду культивирования глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 подтверждается также результатами прижизненного микроскопического исследования (рис. 4, 5). Добавка P_g в бессывороточную среду культивирования С6 и IMR-32 способствует формированию более плотного монослоя клеток по сравнению с контролем, а также препятствует развитию дегенеративных изменений в клеточном пласте.

Т а б л и ц а 1. Влияние плазминогена и стрептокиназы на содержание нуклеиновых кислот и белка в клетках глиомы С6 [13]

Концентрация белка	1 сутки культивирования			3 суток культивирования		
	ДНК, мкг/мл	РНК, мкг/мл	Белок, мкг/мл	ДНК, мкг/мл	РНК, мкг/мл	Белок, мкг/мл
контроль	1,83±0,4	3,29±0,88	53,51±4,84	2,96±1,5	2,6±0,4	36,26±6,8
Плазминоген						
10 ⁻⁷ М	2,18±0,21	6,82±0,77*	83,31±2,18*	9,48±0,3*	10,33±0,7*	192,68±2,68*
10 ⁻⁹ М	2,29±0,12	5,14±0,19*	68,42±4,94*	8,4±3,28*	9,16±1,45*	182,25±10,2*
10 ⁻¹¹ М	2,16±0,32	4,08±0,13	57,28±1,27	8,2±0,13*	7,59±0,88*	177,55±79,1*
Стрептокиназа						
10 ⁻⁷ М	3,88±0,17*	6,62±0,5*	89,79±6,08*	11,8±3,5*	15,4±3,17*	282,8±68,6*
10 ⁻⁹ М	2,94±0,47*	5,02±0,63*	71,19±0,3*	10,9±2,2*	12,62±1,6*	238,98±53,8*
10 ⁻¹¹ М	2,79±0,73	4,85±0,71	68,53±10,42	8,6±0,59	9,82±0,74*	202,82±28,4*

Примечание. * - $p < 0,05$

Т а б л и ц а 2. Влияние пируваткиназы, плазминогена и стрептокиназы на содержание макромолекул в клетках нейробластомы IMR-32 [13, 14]

Концентрация белка	1 сутки			3 суток		
	ДНК, мкг/мл	РНК, мкг/мл	Белок, мкг/мл	ДНК, мкг/мл	РНК, мкг/мл	Белок, мкг/мл
контроль	1,83±0,4	3,29±0,88	53,51±4,84	3,37±0,2	2,87±0,11	56,4±3,25
Пируваткиназа						
10 ⁻⁷ М	4,36±0,73	7,63±0,24*	106,06±2,52*	12,85±2,2*	9,51±0,57*	203,7±17,26*
10 ⁻⁹ М	4,28±1,53	6,92±0,36*	97,14±16,0*	12,3±1,73*	9,31±0,43*	198,91±17,82*
10 ⁻¹¹ М	4,04±0,78	6,58±1,37*	95,64±2,85*	7,82±3,43*	7,77±1,65*	141,88±45,63*
Плазминоген						
10 ⁻⁷ М	2,18±0,21	6,82±0,77*	83,31±2,18*	4,74±0,97*	6,25±1,07*	92,55±9,6*
10 ⁻⁹ М	2,29±0,12	5,14±0,19*	68,42±4,94*	5,42±1,57*	6,55±1,66*	105,9±26,95*
10 ⁻¹¹ М	2,16±0,32	4,08±0,13	57,28±1,27	4,09±0,86	4,91±0,38*	78,05±10,36*
Стрептокиназа						
10 ⁻⁷ М	3,88±0,17*	6,62±0,5*	89,79±6,08*	9,62±1,07*	5,47±1,22*	138,42±15,5*
10 ⁻⁹ М	2,94±0,47*	5,02±0,63*	71,19±0,3*	5,75±0,67*	4,06±1,02*	90,57±5,01*
10 ⁻¹¹ М	2,79±0,73	4,85±0,71	68,53±10,42	4,74±0,69*	3,07±0,11	86,06±6,08*



Рис. 4. Влияние плазминогена или стрептокиназы (10^{-7} М) на состояние культур клеток глиомы С6 через 3 суток культивирования в бессывороточной среде (контроль). Фазовый контраст (Масштабная линейка – 10 мкм) [11-15]

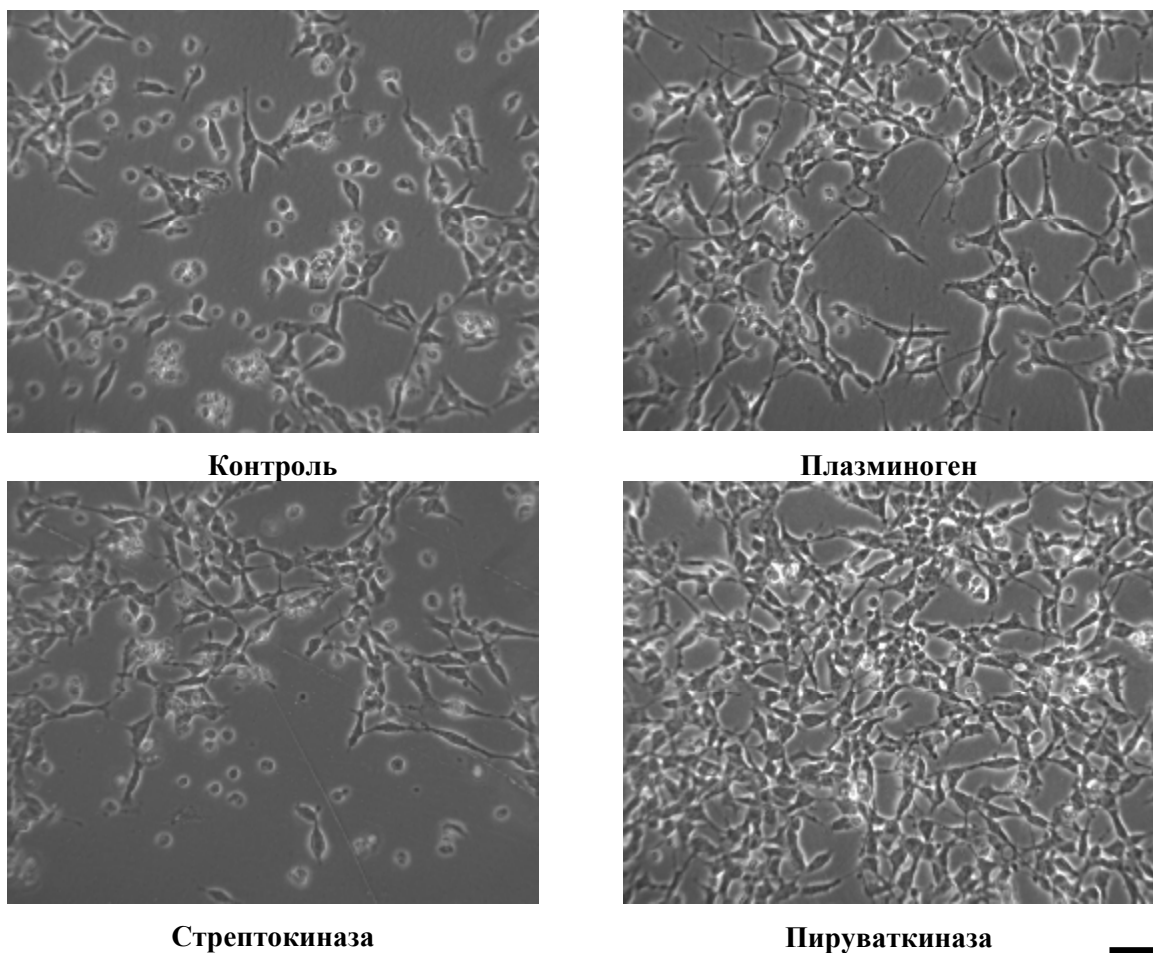


Рис.5. Влияние плазминогена или стрептокиназы (10^{-7} М) на состояние культур клеток нейробластомы IMR-32 через 3 суток культивирования в бессывороточной среде (контроль). Фазовый контраст (Масштабная линейка – 10 мкм) [11-15]

Оказалось, что кратковременная экспозиция клеток феохромоцитомы PC12 с P_g ведет к снижению интенсивности АТФ-активируемого протеолиза на 27-50% в зависимости от

концентрации зимогена (рис. 6). Концентрационная зависимость эффекта имеет сложный характер. Наибольшее подавление АТР-зависимого протеолиза отмечено при концентрации зимоге-

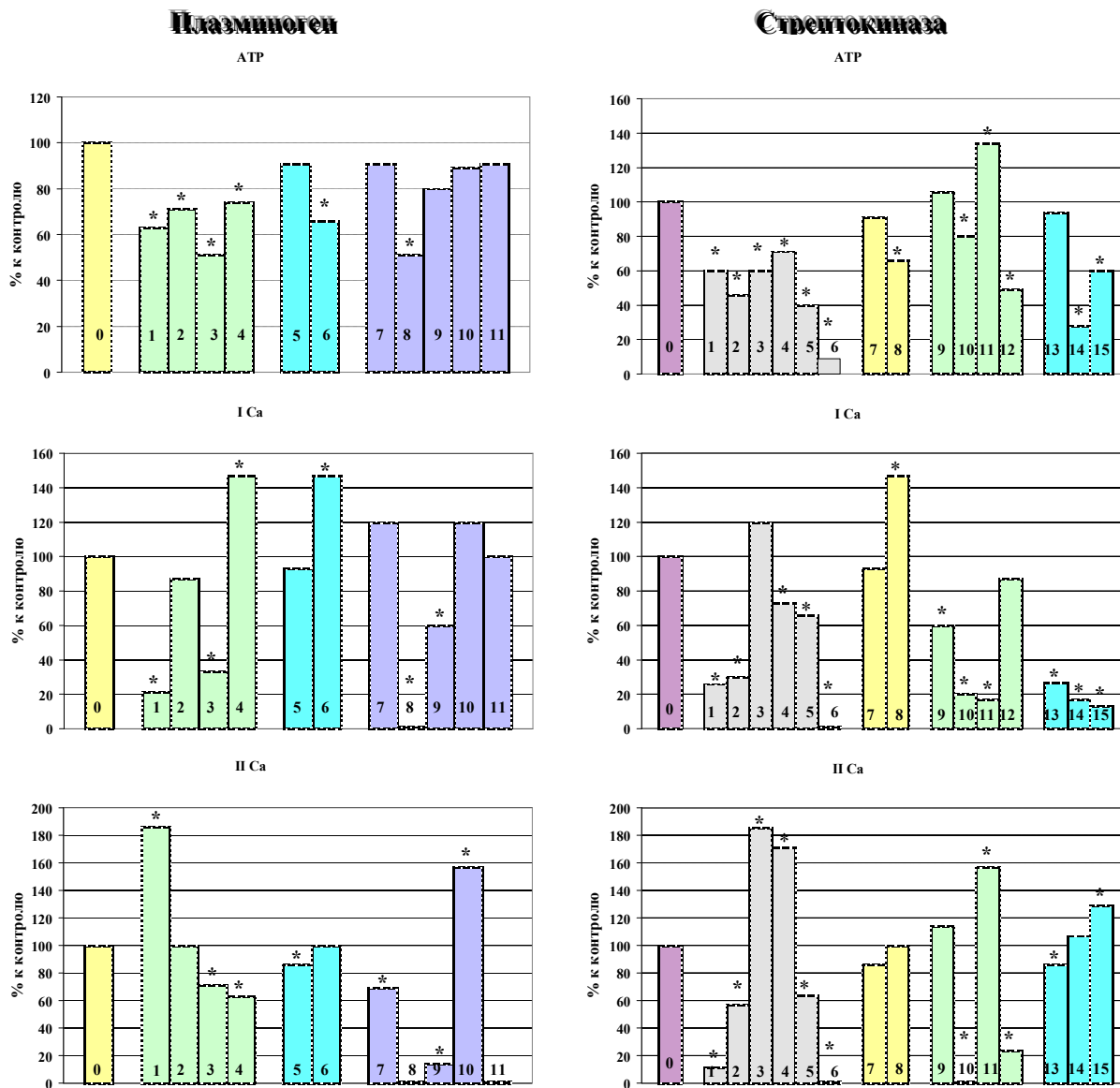


Рис. 6. Активность АТР-, I Ca²⁺- и II Ca²⁺-зависимых протеиназ в клетках PC12 при раздельном и комбинированном внесении в среду инкубации плазминогена или стрептокиназы с фактором роста нервов; время инкубации 20 мин [16, 17]

Плазминоген: контроль – 0, без добавок; 1 – 0,01 мкг/мл Pg; 2 – 0,1 мкг/мл Pg; 3 – 1 мкг/мл Pg; 4 – 10 мкг/мл Pg; 5 – 10 нг/мл NGF; 6 – 100 нг/мл NGF; 7 – 0,1 мкг/мл Pg + 10 нг/мл NGF ; 8 – 1 мкг/мл Pg + 10 нг/мл NGF ; 9 – 1 мкг/мл Pg + 100 нг/мл NGF ; 10 – 10 мкг/мл Pg + 10 нг/мл NGF; 11 – 10 мкг/мл Pg + 100 нг/мл NGF.

Стрептокиназа: контроль – 0, без добавок; 1 – 0,1 МЕ/мл SK; 2 – 1 МЕ/мл SK; 3 – 10 МЕ/мл SK; 4 – 100 МЕ/мл SK; 5 – 1000 МЕ/мл SK; 6 – 2000 МЕ/мл SK; 7 – 10 нг/мл NGF; 8 – 100 нг/мл NGF; 9 – 0,1 МЕ/мл SK + 10 нг/мл NGF; 10 – 1 МЕ/мл SK + 10 нг/мл NGF; 11 – 10 МЕ/мл SK + 10 нг/мл NGF; 12 – 100 МЕ/мл SK + 10 нг/мл NGF; 13 – 100 МЕ/мл SK + 10 нг/мл NGF; 14 – 10 МЕ/мл SK + 100 нг/мл NGF; 15 – 100 МЕ/мл SK + 100 нг/мл NGF; 16 – 1000 МЕ/мл SK + 100 нг/мл NGF

на 1 мкг/мл (10^{-8} М). Добавление в питательную среду одного NGF вело к угнетению (на 35%) АТФ-зависимой активности лишь при максимальной из используемых концентраций нейротрофина. Следует отметить, что именно при близких концентрациях NGF наблюдаются морфофункциональные перестройки клеток PC12 в нейрональные. Однако при смешивании NGF с Pg зимоген уже не оказывал эффекта. Последний практически утрачивался при концентрации NGF даже 10 нг/мл. Ингибирование АТФ-зависимого протеолиза при комбинации Pg+NGF проявлялось (причем в максимальной из наблюдавшихся мере – 50%) лишь в одном варианте: 1 мкг/мл зимогена + 10 нг/мл NGF (рис. 6). Это ингибирование свойственно самому зимогену, нейротрофин его не изменяет. Вместе с тем, удивительно, что NGF в данной концентрации достаточно, чтобы снять воздействие Pg даже при концентрации 10 мкг/мл (10^{-7} М). Складывается впечатление, что взаимодействие Pg и NGF носит сложный характер и, возможно, имеет несколько путей реализации.

На активируемые низкими концентрациями Ca^{2+} (50 мкМ, кальпаин I) реакции протеолиза Pg оказал разноплановое действие (рис.6). При добавке зимогена в диапазоне концентраций 0,01 – 1,0 мкг/мл (10^{-10} - 10^{-7} М) I-кальпаиновая активность снижалась на 70-80%. При максимальной же его концентрации (10 мкг/мл) наблюдалось увеличение этой активности на 40%. Экспозиция клеток PC12 с одним NGF лишь при максимальной концентрации нейротрофина увеличивала I-кальпаиновую активность на 45%. При смешивании Pg+NGF описанные изменения этой активности не проявлялись. Причем, для последнего достаточно даже 10 нг/мл. Вместе с тем, при варианте 1 мкг/мл Pg + 10 нг/мл NGF зафиксировано полное подавление I-кальпаиновой активности (рис.6). Увеличение же концентрации NGF до 100 нг/мл в этом случае вызывало лишь 40% угнетения активности кальпаинов. Сопоставление действия 1 мкг/мл Pg и 100 нг/мл NGF провозглашает допустить наличие в данном случае суммации эффектов двух белков. Эта суммация, однако, не проявлялась, например, в варианте 10 мкг/мл Pg+100 нг/мл NGF: уровень протеолиза не отличался от контроля.

На активируемые более высокими концентрациями Ca^{2+} (5 мМ, кальпаин II) реакции протеолиза кратковременная экспозиция клеток феохромоцитомы с Pg оказала иное действие. (рис. 6) При минимальной (0,01 мкг/мл) концентрации зимогена наблюдалось увеличение II-кальпаиновой активности на 80%, а при концентрации 1,0 – 10 мкг/мл белка (10^{-10} - 10^{-7} М) – угнетение на 30-40%. Добавки одного NGF мало влияли на эту активность. Вместе с тем, именно в концентрации 10 нг/мл нейротрофин вызвал небольшое (на 20%) угнетение данной протеолитической активности. Смешивание Pg+NGF вело к проявлению несколько иной картины, чем при АТФ-зависимом протеолизе и I-кальпаиновой активности. В вариантах с 10 мкг/мл Pg при 10 нг/мл NGF повышался уровень протеолитической активности на 55%. При максимальной его концентрации отмечено полное подавление последней. Аналогичная картина отмечена в вариантах эксперимента с 1 мкг/мл Pg. Здесь было достаточно добавить NGF уже в минимальной концентрации. Вместе с тем, ни сам зимоген, ни NGF не вызывали даже близких этому изменений. При смешивании Pg в концентрации 0,1 мкг/мл (когда сам по себе зимоген не влиял на изучаемый показатель) с 10 нг/мл NGF подавление протеолитической активности было более выраженным, чем при действии одного нейротрофина – 50%.

1.2 Стрептокиназа

В экспериментах на диссоциированных культурах неокортекса новорожденных крыс установлено, что перевод их на 14 сутки на дефицитную по белкам сыворотки (0,5% телячьей сыворотки - ТС вместо 15%) питательную среду через 48 часов вызывал статистически значимое снижение доли жизнеспособных клеток (табл. 3). Внесение в дефицитную среду SK сохраняло этот показатель на уровне, не отличающемся от такового на обогащенной сывороткой питательной среде. При переводе на дефицитную по белкам среду 7-суточных культур, количество жизнеспособных клеток также снижалось. Обработка таких культур стрептокиназой вела к дальнейшему уменьшению доли жизнеспособных клеток.

Как показали результаты электронной микроскопии, клетки нервной ткани при культивировании эксплантатов коры головного мозга новорожденных крысят на среде,

содержащей 15% ТС, сохраняли структурную организацию. Ядра нейронов расположены в центре, занимают значительный объем клетки, характерны равномерно диспергированным хроматином, имеют гладкую и ровную ядерную мембрану (рис.7). Цитоплазма существенно не изменена, органеллы типично и равномерно расположены. Морфология клеток глии также сохраняла характерные черты.

При переводе культуры на среду с дефицитом по белкам сыворотки уже через 24 часа в астроцитах отмечены конденсация хроматина, появление множественных глыбок гиперхром-

Т а б л и ц а 3. Влияние стрептокиназы на жизнеспособность культур клеток неокортекса новорожденных крыс [18]

Возраст культур	№ групп	Состав питательной среды	Жизнеспособность клеток, % (X ± Sx)	Статистическая значимость
7 сут in vitro	1	DMEM + 15% ТС	87,8±1,6	P ₁₋₂ <0,01 P ₁₋₃ <0,01
	2	DMEM + 0,5% ТС	82,3±0,23	P ₂₋₃ <0,001
	3	DMEM + 0,5% ТС + SK 2000 МЕ/мл	76,45±1,15	
14 сут in vitro	4	DMEM + 15% ТС	88,13±0,14	P ₄₋₅ <0,001 P ₄₋₆ <0,1
	5	DMEM + 0,5% ТС	80,20±1,4	P ₅₋₆ <0,01
	6	DMEM + 0,5% ТС + SK 2000 МЕ/мл	89,84±1,05	

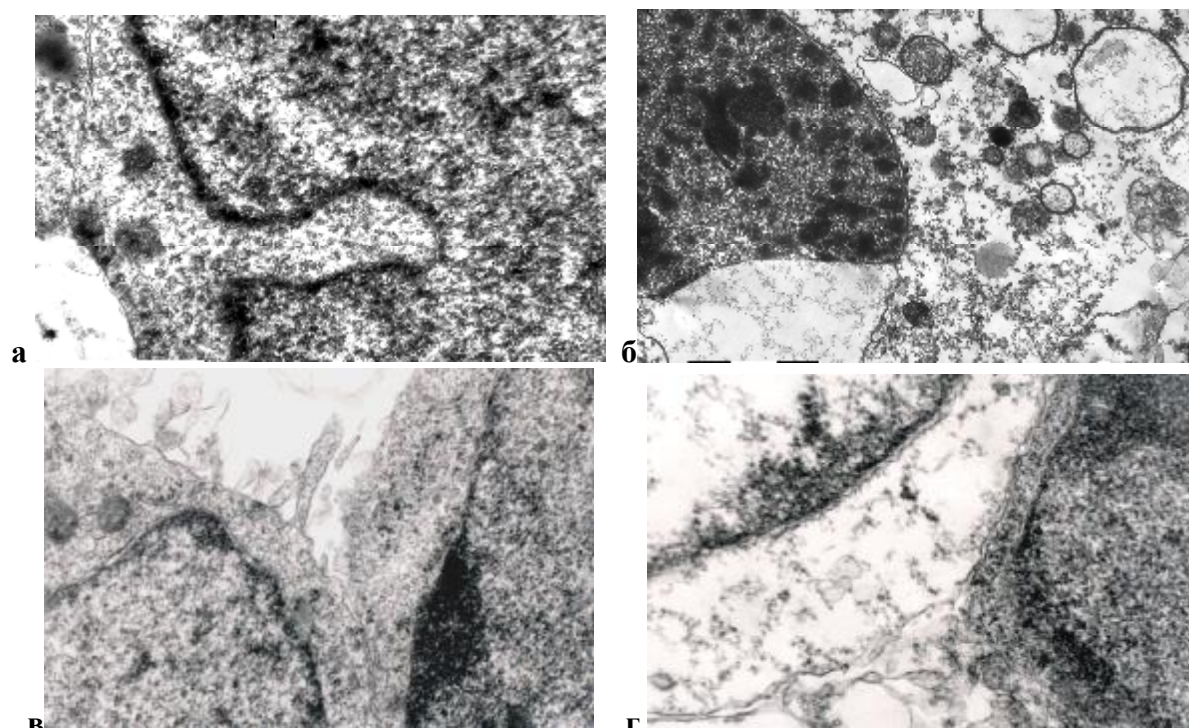


Рис.7. Влияние стрептокиназы на ультраструктуру клеток коры головного мозга новорожденных крыс в органной культуре. 5 сут in vitro. а –изменения ядра нейрона, вызванные переводом культуры на среду с дефицитом по белкам сыворотки (ТС 0,5%).

24 часа экспозиции. Ув.19000. б –изменение астроцита при культивировании КГМ новорожденных крыс на питательной среде с 0,5% ТС. 24 часа экспозиции. Ув.10000. в – тесное прилегание нейрон-нейрон в эксплантате. 24 часа экспозиции в питательной среде, обедненной белками сыворотки крови с добавкой стрептокиназы (2000 МЕ). Ув. 29000. г –нейрон и прилегающий к нему астроцит. 24 ч экспозиции в питательной среде, обедненной белками сыворотки крови с добавкой стрептокиназы (2000 МЕ). Ув.29000. [18]

ного материала с предпочтительной локализацией у внутренней мембраны ядра. Сама мембрана расслаивалась, образуя выпячивания в сторону цитоплазмы. Цитоплазматические органеллы теряли характерную морфологию и вакуолизировались. Реактивные изменения отмечены в ядрах нейронов. В нейропиле отростки теряли правильную форму, их мембрана расслаивалась, исчезали органеллы [18]. Если культивирование на дефицитной по белкам среде сочетали с добавкой SK (2000 МЕ/мл, 10^{-5} М), то описанные выше деструктивные изменения не проявлялись. Организация эксплантата сохранена, прилегание нейрон-нейрон, нейрон-астроцит – тесное. Лишь между нейронами и сателлитной глией обнаружена дезинтеграция контактов. Структура клеток нервной ткани: форма клеток и их ядер, распределение хроматина – характерны для каждого типа клеток, не несли признаков деструкции. Органеллы нейронов достаточно развиты, цитоплазма оптически плотна, содержала цистерны и везикулы комплекса Гольджи, полисомы, рибосомы, каналы эндоплазматического ретикулума. Интересной особенностью является обилие в нейронах митохондрий с умеренно плотным веществом и выраженными кристами. Через 48 часов экспозиции в такой среде астроциты. в поле зрения редки. Это дает основание считать, что именно они поражаются в первую очередь. Появляются клетки, содержащие многочисленные миелиновые тельца, лизосомы и вакуоли. По-видимому, это результат поглощения обломков разрушившихся клеток. В то же время, нейроны к такому воздействию оказались более устойчивы.

Эти результаты подтверждают наши прежние наблюдения: SK способна воздействовать на клетки и ткани непосредственно, минуя кровоток [19]. Принципиально, это ставит на иную платформу изучение ее биологического действия, ибо с таких позиций эффекты SK являются чрезвычайно слабо изученными.

Как явствует из полученных нами материалов, результат воздействия SK во многом зависит от типа клеточных элементов и состояния их, в частности, от возраста ткани. Более того, есть основания думать, что действие SK имеет триггерный характер и может быть направлено на стабилизацию структуры и функции клетки, что выражалось в увеличении жизнеспособности клеток в неблагоприятных условиях. Вместе с тем, более продолжительное действие данного активатора плазминогена вело к явным деструктивным изменениям клеток. При этом складывается впечатление, что в коре головного мозга наиболее чувствительны прежде всего, астроциты, тогда как нейрональные клетки более устойчивы. Это, разумеется, не означает их “полной” резистентности. Как показали электрофизиологические исследования [20], суперфузия понтобульбоспинального препарата мозга крысы раствором SK вела к обратимому возрастанию частоты генерации респираторных залпов на 50 – 55% со снижением на 15 – 20% амплитуды низко- и среднечастотных пиков разрядов. Следовательно, изменения со стороны нейронов также могут иметь место. Важный вопрос – пути (механизмы) воздействия SK на клетки. Она – ксеногенный белок, о наличии к ней рецепторов на клеточных мембранах нет данных, хотя полностью исключить такую возможность нельзя. С другой стороны, действие ее по плазминоген-активаторному пути (рецепторы плазминогена найдены на многих клетках) представляется весьма маловероятным. Используемая в наших экспериментах SK взята в достаточно высокой концентрации – порядка $5 \cdot 10^{-6}$ М. А известно, что при избытке SK активный плазмин не образуется. Надо сказать, что в опытах со SK на культурах симпатобластов и спинальных ганглиев мы не фиксировали появление фибринолитической (плазминовой) активности [21], однако энзиматический анализ свидетельствовал о практически нерасщепленной SK в таких культурах. Возможно, действие SK осуществлялось как раз по

супероксидконвергирующему пути. Вместе с тем, молекулярно-клеточные аспекты действия этого белка пока далеки от исчерпывающей ясности.

SK, подобно Pg, во всех концентрациях способствовала увеличению жизнеспособности клеток глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 в бессывороточных условиях культивирования и стимулировала их пролиферацию на протяжении всего времени наблюдения [15]. В концентрациях 10^{-7} – 10^{-11} М она оказывала явный митогенный эффект, что выражалось в увеличении ИП уже через 24 ч культивирования. Так, ИП клеток глиомы С6 в этот период увеличился на 125–147 % в сравнении с контролем. Добавка SK в среду культивирования глиомы С6 на третьи сутки вела к увеличению ИП на 230–365 % в сравнении с контрольными значениями (рис. 2). Через 24 ч культивирования нейробластомы с SK в концентрации 10^{-7} – 10^{-9} М ИП увеличивался на 26–42%, а через трое суток – на 45–130 % (рис. 3). SK вызывала увеличение содержания ДНК, РНК и белка в клетках, начиная уже с первых суток культивирования (табл. 1, 2) [15]. Стимулирующее влияние SK было выражено сильнее, чем действие Pg, на что указывает более высокая пролиферативная активность клеток. Эффект SK был более выражен в отношении клеток глиомы в сравнении с клетками нейробластомы. Судя по результатам фазово-контрастной микроскопии, SK оказывала стимулирующее действие на развитие клеток этих двух перевиваемых линий (рис. 3, 4).

Защитное действие SK явственно проявлялось при холодовом стрессе [22]. Холодовой стресс вызывал полную гибель культур, развивающихся в контрольной среде, содержащей 0,5% сыворотки крови – ганглии отклеивались от подложки, клетки зоны роста округлялись и всплывали – и частичную гибель культур, развивающихся в питательной среде, содержащей 10% ТС.

Добавка SK в питательные среды в значительной степени помогала культивируемым спинальным ганглиям преодолевать холодовой стресс. Внешний вид культуры оставался прежним. Фиксировались лишь незначительные повреждения отдельных клеток, составляющих зону роста культивируемых ганглиев. Кроме того отмечена важность предварительной адаптации культур к холоду (3-хкратно по 2 часа при $8-10^{\circ}\text{C}$).

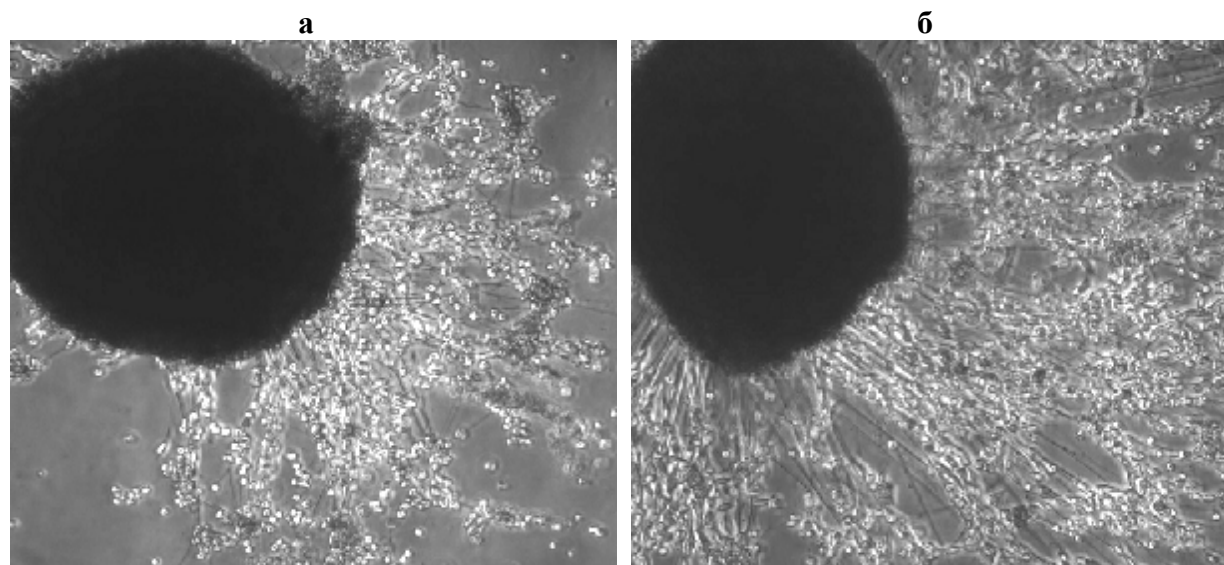


Рис. 8. Спинальный ганглий новорожденной крысы, 5 суток *in vitro*, после выдерживания 24 ч при 8°C ; **а** - контроль, **б** – при культивировании в присутствии 2000 МЕ/мл SK. Проходящий свет, увеличение 7×10 [22]

SK существенно влияла на скорость формирования зоны роста у культивируемых ганглиев. Во всех экспериментах при изучении действия добавки SK в состав ростовой среды при выращивании культур чувствительных спинального и симпатического краниального шейного ганглиев результаты были однонаправлены. Для ганглиев, культивируемых в полной питательной среде, в состав которой входило 10% ТС, влияние SK было более выражено.

Зона роста культур, в питательной среде которых содержалась SK, имела повышенную плотность при сравнении с контролем за счет интенсивной пролиферации и миграции из эксплантата клеток различной природы. Особо выделялись многочисленные шванновские клетки, расположенные вдоль радиально направленных отростков нервных клеток (рис. 9).

Длительное наблюдение за культурами (свыше 14 сут *in vitro*) показало способность SK в питательной среде, содержащей 10% сыворотки крови, значительно улучшать рост и развитие симпатических и чувствительных спинальных ганглиев новорожденной крысы.

Полученные ранее факты на клетках иного характера - феохромоцитомы PC12 [17], дают основания рассматривать SK в качестве одного из регуляторных белков. Кратковременная экспозиция клеток феохромоцитомы со SK вела к подавлению АТФ-активируемого протеолиза на 30 – 60%, а при концентрации SK 2000 МЕ/мл (10^{-5} М) – на 90% (рис.6). Добавка в питательную среду одного NGF лишь при концентрации 100 нг/мл вызвала умеренное (на 35%)

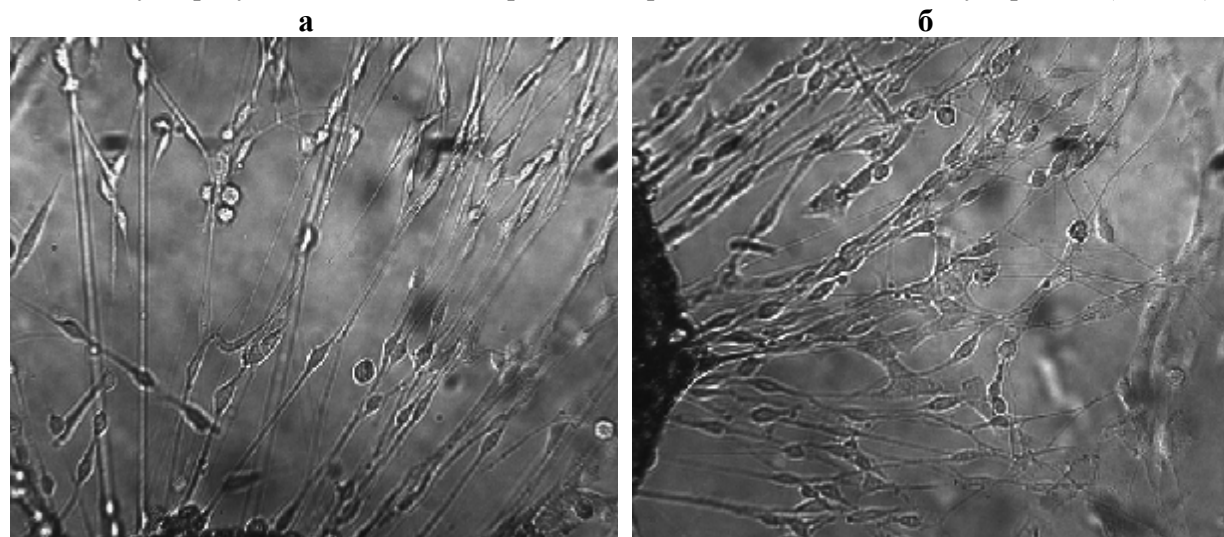


Рис. 9. Живая культура, периферический участок зоны роста спинального ганглия новорожденной крысы, 10 суток *in vitro*увеличение 7×16 , проходящий свет,
а – контроль, б – добавка стрептокиназы, 10^{-7} М [15]

снижение уровня АТФ-активируемого протеолиза. При смешивании нейротрофина и SK наблюдали следующую картину.

При концентрации нейротрофина 10.0 нг/мл снижение уровня АТФ-активируемого протеолиза, вызванное SK в концентрации 0.1 или 1 МЕ/мл ($5 \cdot 10^{-10}$ или $5 \cdot 10^{-9}$ М) практически снималось. На фоне действия NGF увеличение концентрации SK до 10 МЕ/мл вело к возрастанию интенсивности энергозависимого протеолиза в 1,3 раза. Вместе с тем, в варианте, 100 МЕ/мл SK +10 нг/мл NGF отмечено угнетение данного типа протеолиза на 55%, что свидетельствует об изменении характера перестройки внутриклеточных процессов. Увеличение концентрации NGF до 100.0 нг/мл в сочетании с 10 МЕ/мл SK ($5 \cdot 10^{-8}$ М) практически не влияло на уровень АТФ-зависимого протеолиза, а при концентрации ее 100 или 1000 МЕ/мл ($5 \cdot 10^{-7}$ или $5 \cdot 10^{-6}$ М) обусловило уменьшение интенсивности этого протеолиза. Причем, эффект в случае концентрации SK 100 МЕ/мл и 100 нг/мл NGF был близок к суммарному индивидуальных

белков. При более высокой концентрации SK при сочетании с нейротрофином степень угнетения (40%) не достигали таковой одной SK в этой концентрации (60%).

На активируемые Ca^{2+} в низких концентрациях (50 мкМ, кальпаин I) реакции протеолиза добавки SK оказали, как правило, угнетающее действие (рис.5). Причем, эффект SK в низких концентрациях проявлялся заметно сильнее. Угнетение составило 75 – 80%. При концентрации же SK 10 МЕ/мл экспозиция клеток PC12 сопровождалась даже тенденцией к росту указанной протеолитической активности. Добавка в питательную среду одного NGF лишь при концентрации 100 нг/мл вызвала изменение уровня I-кальпаиновой активности: возрастание на 45%. При сочетании же SK и NGF практически во всех случаях отмечено снижение указанной активности в сравнении с контролем на 40 – 90%. Лишь при варианте SK, 100 МЕ/мл + NGF, 10 нг/мл изменения со стороны I-кальпаиновой активности не превышали 16%. Примечательно, что добавление NGF в концентрации 10 нг/мл (само по себе не оказавшее влияния на I-кальпаиновую активность) достаточно заметно модифицировало эффект SK: при концентрации ее 0.1 МЕ/мл угнетение этого типа протеолиза значительно уменьшалось, тогда как при концентрации 10.0 МЕ/мл резко проявлялось и составило 80% убыли по отношению к контролю. Использование NGF при концентрации 100 нг/мл резко усиливало подавление I-кальпаиновой активности клеток феохромоцитомы SK, в диапазоне концентрации 10-1000 МЕ/мл.

На активируемые Ca^{2+} в более высокой концентрации (5 мМ, кальпаин II) добавки одного NGF влияния не оказали (рис. 6). Экспозиция клеток феохромоцитомы PC12 со SK вызвала неоднонаправленный эффект в зависимости от концентрации этого активатора Pg: при концентрации SK 0.1 и 1 МЕ/мл наблюдалось угнетение II-кальпаиновой активности на 90% и 45% соответственно. Увеличение ее концентрации до 10 и 100 МЕ/мл сопровождалось возрастанием II-кальпаиновой активности в 1.7 – 1.8 раза. Дальнейшее увеличение концентрации SK до 1000 и 2000 МЕ/мл вело к подавлению данной протеолитической активности на 40% и 100% соответственно.

При смешивании SK с NGF эффект ее изменялся существенно, сложным неоднонаправленным образом. В концентрации 10 нг/мл NGF практически снимал ингибиторное действие SK в концентрации 0.1 МЕ/мл, но резко усиливал это действие при концентрации ее 1.0 МЕ/мл – до 100%. Характер действия SK при концентрации 10 МЕ/мл в присутствии 10 нг/мл нейротрофина фактически не менялся, тогда как увеличение ее концентрации до 100 МЕ/мл в этих условиях вело к подавлению II-кальпаиновой активности на 80%. В сочетании же с NGF в более высокой концентрации (100 нг/мл) стимулирующее II-кальпаиновую активность действие SK не проявлялось. Также снималось полностью и подавление данного типа протеолитической активности, наблюдавшееся при действии одной SK в концентрации 1000 МЕ/мл.

Принимая во внимание среднюю величину молекулярной массы SK равной 50 кДа и с учетом удельной активности образцов SK высокой степени чистоты, можно считать, что концентрация этого белка 0.1 МЕ/мл соответствует $5 \cdot 10^{-10}$ М. Тем не менее, этой концентрации эффектора оказалось достаточно, чтобы вызвать существенное подавление интенсивности всех трех типов исследуемых протеолитических реакций на 40 – 90 % по отношению к контролю. Это тем более необычно, что SK – аллогенный для феохромоцитомы PC12 белок, продуцируемый β -гемолитическими стрептококками. Из данных литературы не известно о возможности существования в подобных клетках какого-либо белка структурно близкого стрептокиназе.

Как и при действии Pg, добавление SK к культуре феохромоцитомы PC12 вело к угнетению АТР-активируемого протеолиза. Однако оно было более сильным, а сочетание этого белка с нейротрофином (даже при концентрации последнего 100.0 нг/мл) не всегда сопровождалось «снятием» эффекта SK, хотя в ряде вариантов степень подавления АТР-активируемого протеолиза при действии SK с NGF была меньшей, чем в случае одной SK.

Добавка SK сама по себе вызвала сильное подавление I-кальпаиновой активности, достигающее до полного ее отсутствия при действии SK в концентрации 2000.0 ME/мл. Практически ни в одном случае мы не наблюдали повышения уровня этого типа Ca^{2+} -активируемого протеолиза, даже в сочетании SK с нейротрофином. Более того, при таком сочетании эффект подавления даже усиливался.

В отличие от Pg, экспозиция клеток PC12 со SK вызвала более сложный характер зависимости «эффект-концентрация» в случае II-кальпаиновой активности. Вместе с тем, сочетание SK с NGF чаще сопровождалось уменьшением эффекта SK, хотя в отдельных вариантах наблюдалось резкое изменение направленности сдвигов этого типа протеиназной активности.

1.3 Cu,Zn-супероксиддисмутаза

Учитывая наличие у SK достаточно выраженной супероксидконвергирующей активности [2, 5, 6], нами было изучено влияние одной из истинных супероксиддисмутаз – Cu,Zn-содержащей на диссоциированные культуры краниального шейного ганглия новорожденной крысы. В присутствии в питательной среде этого фермента в концентрациях 10^{-7} и 10^{-8} M уже спустя 1 сутки *in vitro* наблюдалось увеличение адгезии клеток к субстрату, что приводило к большей выживаемости культур симпаточитов по отношению к контрольным культурам. В присутствии супероксиддисмутазы ускорялось развитие нейронов: вырост отростков, изменение их длины, увеличение размера сомы нервных клеток. Уже через 7 суток в таких культурах отмечалось значительное количество нейронов, имеющих длинные ветвящиеся отростки часто собранные в пучки, развивались многочисленные межнейронные связи. Кроме того, начиналась активная пролиферация сопутствующих ненейрональных клеток (рис. 10).

1.4 Пируваткиназа

Направленность эффекта РК, как выяснилось, зависит от типа клеток. Так, было выявлено стимулирующее действие добавки РК в среду культивирования клеток нейробластомы IMR-32, но не глиомы С6. Причем стимулирующее действие РК на клеточную пролиферацию и их жизнеспособность проявлялось даже сильнее, чем действие Pg и SK (рис. 2-5).

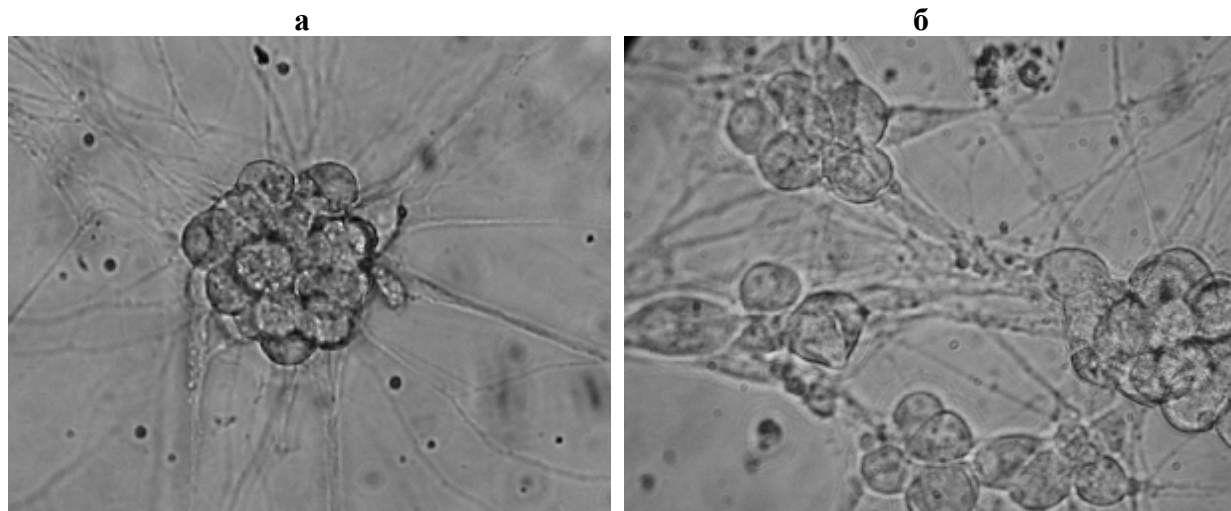


Рис. 10. Диссоциированная культура краниального шейного ганглия новорожденной крысы, проходящий свет, увеличение 10×16 , 7 суток *in vitro*, **а** – контроль, **б** – СОД, 10^{-8} M

Через 1 сут культивирования нейробластомы с РК не было выявлено ее действия на пролиферацию клеток нейробластомы. Через 3 сут в присутствии 10^{-7} – 10^{-11} M РК ИП увеличивался на 127–249%

(рис. 3). В присутствии РК наблюдали также увеличение содержания макромолекул в клетках IMR-32 (табл. 2).

2. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СПЕЦИФИКИ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ

Фактор роста нервов - белок общей молекулярной массы 131 кДа, содержащий 1-2 атома цинка. Вероятнее всего 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, Ca^{2+} -зависимой стимуляции выхода ацетилхолина, дифференцировку, пролиферацию и биосинтетические свойства 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 обнаружение у γ -субъединицы P_g-активаторной способности. Вместе с тем, считалось, что остальные субъединицы (β - и α -) лишены подобных свойств.

Проведенные нами исследования образцов NGF и его субъединиц высокой степени чистоты (по данным электрофореза и изоэлектрофокусирования) показали [19, 23, 24] наличие такой активности и у β -субъединицы (основного носителя нейроростовой активности). 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, α -субъединица полностью лишена подобной способности. Группоспецифические ингибиторы протеиназ — р-хлормеркурибензоат, 8-оксихинолин и о-фенантролин умеренно угнетали активность лишь β -субъединицы: на 33% и на 22-25%. 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 [19].

Методом люминолзависимой хемилюминесценции показано [19, 23, 24], что в присутствии γ - и β -субъединиц (но не α -) наблюдается резкая вспышка хемилюминесценции с последующим затуханием, свидетельствующим о разложении H_2O_2 с образованием активных форм кислорода. В двух модельных системах генерирования супероксидного радикала установлено, что и олигомер и субъединицы подавляли 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 [23, 24].

Методом лизиса ДНК селезенки или тРНК дрожжей в тонком агаровом слое с последующей визуализацией зон лизиса обработкой 2 н HClO_4 установлена эндонуклеазная активность при pH 7.4 по обоим субстратам у всех трех субъединиц [19]. Обе эндонуклеазные активности проявлялись β -субъединицей при более низких ее концентрациях, чем других субъединиц (рис. 11). 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.

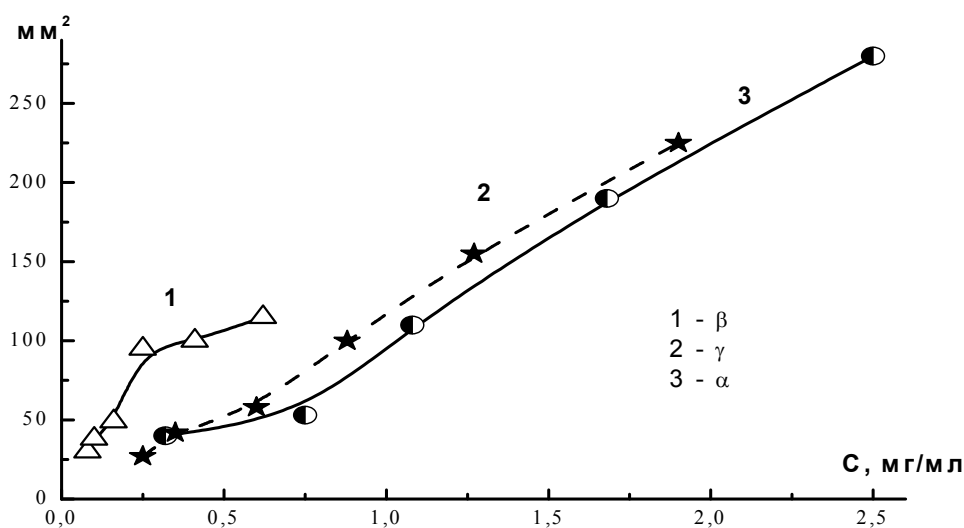


Рис.11. Зависимость ДНК-азной активности (мм^2 зон лизиса ДНК) субъединиц фактора роста нервов от их концентрации ($n=5$; 0.05 М трис-НСI буфер рН 7.6; пластина агара 1.5%, содержащая 20 мг ДНК селезенки; 37°C, 24 часа) [19]

Исследования действия традиционных эффекторов эндонуклеаз - ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , а также ЭДТА, цитрата, арсенита, L-лизина, L-гистидина и L-аргинина в конечной концентрации 10^{-3} М показало, что ДНК-азную активность α -субъединицы все эффекторы подавляли на 50-65%. ДНК-азная активность β -субъединицы повышалась при добавках 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 [19].

РНК-азная активность α -субъединицы лишь при добавке арсенита или лизина возрастала на 30-40%, β -субъединицы была мало чувствительна к эффекторам (лишь ЭДТА несколько угнетал ее), активность γ -субъединицы угнеталась всеми катионами металлов на 20-45% [19]. Все эти факты дают основания 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 и характер этого взаимодействия остается недостаточно ясным), но и путем расщепления белка, связывающего инсулин-подобный фактор роста [25], а также воздействия на NGF-рецептор ядра [26, 27]. 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, наконец, раскрытию структурных основ проявления обнаруженных функциональных особенностей.

Полученные метариалы позволили предложить приемы культивирования клеток нервной ткани (на дефицитной по белкам сыворотке крови питательной среде: 0,5% сыворотки крови вместо 15-25%), обеспечивающие ускорение созревания, улучшение адгезии, высокую выживаемость,

увеличение количества и длины отростков, их арборизации. В частности, такой результат получен на культурах ткани неокортекса и мозжечка. Выявлены особенности ультраструктурных перестроек клеток нервной ткани (нейронов, астроцитов, олигодендроцитов), отражающее протекторное действие Pg и SK. В присутствии Pg общее число клеток глиомы C6 возрастало в несколько раз, а SK позволяла вести культуру феохромоцитомы PC12 на дефицитной по белкам сыворотки крови среде практически без потери числа клеток и выживаемости их не менее 95% в сравнении с контролем. 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 ранее неизвестные свойства: участие в протеолитических процессах (Pg-активаторную и прямую протеолитическую активность), генерировании и трансформации активных форм кислорода, прежде всего, супероксидного радикала, эндонуклеазную (ДНК-азную и РНК-азную) активность. Эти факты позволяют не только переосмыслить механизмы биологического действия NGF. Они создают предпосылки для проработки подходов к созданию биоимитаторов лигандов специфических для нейротрофиновых рецепторов. Спредставляется 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 по тексту направлениях, которые разрабатываются нашим институтом в содружестве с другими научными учреждениями.

REFERENCES

1. Nikandrov, V. N., Pyzhova, N.S. and Sudnik, Yu.M., A role of medium oxygen in the realization of the streptokinase initiated fibrinolysis. *Doklady of Acad. Sci. BSSR*. 1986, **30**: 558-560 (Russian).
2. Nikandrov, V.N. and Pyzhova, N.S., The oxygen-dependent pathway of human plasminogen activation. In: *18th FEBS Meeting. Abstracts*. Ljubljana, 1987, p. 84.
3. Nikandrov, V. N., Oxygen-dependent processes of proteolysis. In *14th International Congress of Biochemistry. Abstracts*. Prague, 1988, Vol. 1, p. 60.
4. Nikandrov, V.N., Oxygen-dependent reactions of proteolysis: essence of the hypothesis, fundamental and applied aspects. In: *“Profilactics and therapy of infectious and parasitic diseases”*. Rytik, P.G. et al (eds.), Nauka i tekhnika Eds., Minsk, 1995, pp. 274-286. (Russian)
5. Nikandrov, V.N., On the plasminogen-activating function of streptokinase. *Int. J. Biochem.* 1992, **24**: 47-53.
6. Nikandrov, V.N. and Pyzhova N.S., Oxygen-dependent pathway of plasminogen activation and new physico-chemical mechanisms of proteolysis. *News Biomed. Sci.* 2001, № 1, 54-60. (Russian)
7. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Some unusual manifestation of proteolysis *Cell. Mol.Biology*. 2006, **52**: 4, 30-39.

8. Nikandrov, V.N., Vorobyova, G.V., Murashko, O.N., Pyzhova, N.S., Kvyatkovskaya, N.V., Bartalevich, O.A. and Danilovich, T.V., Interaction of streptokinase and human plasminogen with oxydoreductases and pyruvate kinase: formation of stable complexes in aqueous-salt solution. *Doklady of Acad. Sci. Belarus.* 1997, **41**: 3, 69-75. (Russian)
9. Nikandrov, V.N., Murashko, O.N., Vorobyova, G.V., Pyzhova, N.S., Kvyatkovskaya, N.V. and Bartalevich, O.A., Integration of human plasminogen or streptokinase into stable complexes with oxidoreductases and pyruvate kinase. *Letters in Peptide Science.* 1997, **4**: 497-502
10. Zhuk, O.N., Kalunov, V.N., and Nikandrov, V.N., The electron-microscopy analysis of interaction of glutamate, plasminogen and nerve growth factor on the level of sympathetic neurons. *In: Kolosov readings-2002. IV Internat. Meeting on functional neuromorphology. Abstracts.* St.Peterburg, 2002, p. 110. (Russian)
11. Romanovskaya, A.A. The effect of plasminogen on functional and metabolic state of glioma C6 cells. *Proc. NAS of Belarus. Biol. Sciences.* 2006, № 5, 158-160 (Russian).
12. Romanovskaya, A., Zhuk, O. and Nikandrov, V. The role of plasminogen at the nervous tissue cultivation. *Science and innovations.* 2007, № 3, 24-27 (Russian).
13. Romanovskaya, A.A. and Nikandrov, V.N. Plasminogen and streptokinase in the regulation of the proliferation of glioma C6 and neuroblastoma IMR-32 cells. *Doklady of NAS of Belarus.* 2007, **51**: 2, 57-60 (Russian)
14. Romanovskaya, A.A. and Nikandrov, V.N. The effect of streptokinase and streptokinase-pyruvate kinase equimolar complexes on glioma C6 *Proc. NAS of Belarus. Med. Sciences.* 2007, № 1, 69-74 (Russian).
15. Nikandrov, V.N., Romanovskaya, A.A. and Polukoshko, H.F. The effect of proteins of pathogenic microorganisms on mammalian cells: the changes of vital activity of nervous tissue cells in the presence of streptokinase. *Annales of Vitebsk State Acad. of Vet. Medicine.* 2006, **43**: 3, 115-118 (Russian).
16. Nikandrov, V.N., Petrusenko, G.P., Gronskaya, R.I. and Tumilovich, M.K., Changes in the intensity of ATP- and Ca^{2+} -dependent proteolysis in pheochromocytoma PC12 cells, induced by plasminogen and nerve growth factor. *News Biomed. Sci.* 2003, № 2, 54-57. (Russian)
17. Nikandrov, V.N., Petrusenko, G.P. and Gronskaya, R.I., The state of ATP- and Ca^{2+} -dependent proteolysis in pheochromocytoma PC12 cells under additions of streptokinase and nerve growth factor. *News Biomed. Sci.* 2003, № 4, 84-87. (Russian)
18. Nikandrov, V.N., and Zhuk, O.N., Effect of streptokinase on the development of brain cortical cells in vitro. *Morphology (St. Peterburg).* 2005, **128**: № 5: 33-36. (Russian).
19. Nikandrov, V. N., and Pyzhova, N.S., Regulatory proteins: functional properties of molecules and mechanisms of their biological action. *News Biomed. Sci.* 2003, № 3, 75-89. (Russian)
20. Nikandrov, V.N., Pyatin, V.F., Alexeyeva, A.S., Miroshnichenko, I.V., Yakunina, O.V., Novoselova, A.M., Garkun, Y.S., Murashko, O.N. and Kulchitsky, V.A., Modulation of the central respiratory activity by plasminogen, streptokinase and their complexes with pyruvate kinase. *News Biomed. Sci.* 2003, № 2, 40-43. (Russian)
21. Nikandrov, V.N., Volodkovich, O.I., Gronskaya, R.I., Zhuk, O.N., Schpak, H.A., Lukashevitch, I.B., Polukoshko, E.F., Petrusenko, G.P., and Tumilovich, M.K., The effects of pericellular proteolysis components on nervous tissue cells. *In Achievements of medical science of Belarus. Annual.* № 7, pp. 49-50. (Russian).
22. Polukoshko, E.F., and Nikandrov, V.N., Influence of streptokinase (SK) on cold adaptation of newborn rat spinal ganglion in culture. *In: Sakharov readings 2005: environmental problems of XXI century.* Kundas, S.P. et al. (eds). Part I. Gomel, 2005, pp. 148-149. (Russian).

23. Nikandrov, V.N., Pyzhova, N.S., Lukashevitch, V.S., Lukashevitch, I.B., Agurkov, A.V., Davydovsky, A.G. and Schpak, H.A., Functional properties of nerve growth factor molecule. In: *18 Intern. Congress of Biochem. Mol. Biol. Abstract Book*. Birmingham, 2000, p. 317 (№ 1152).
24. Nikandrov, V.N. and Pyzhova, N.S., Enzymatic properties of nerve growth factor and its subunits. In: *Transactions of All-Russian Meeting "The problems of medical enzymology"*. Berezov T.T. (ed). Moscow, 2002, p. 163-164 (Russian).
25. Rajah, R., Bhala, A., Nunn, S t. E., Peehl, D.M. and Cohen, P., *Endocrinology*. 1996, **137**: 2676-2682.
26. Rakowicz-Szulczynska, E.M., Herlyn, M. and Koprowski, H., *Cancer Res*. 1988, **48**: 7200-7206.
27. Samagh, B.S. and Gregory, K.F., *Biochim. biophys. acta*. 1972, **273**: 188-198.

Contents



СОЛВЕНТНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОДГОТОВКИ И ПЕРВИЧНОЙ ПРОМЫСЛОВОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ПРИРОДНЫХ БИТУМОВ

Александр Ю.Копылов¹, Исмагил Ш.Хуснутдинов²

¹ОАО «ВНИИУС», ²Казанский Государственный технологический университет, г.Казань

SOLVENT TECHNOLOGY OF PREPARATION AND PRIMARY OILFIELD PROCESSING OF NATURAL BITUMEN

Alexander Yu. Kopylov¹, Ismagil Sh. Khusnutdinov²

¹J.S.C. “VNIUS”, ²Kazan State technological university, Kazan

3

ПОДГОТОВКА ВЫСОКОВЯЗКИХ СЕРОВОДОРОДСОДЕРЖАЩИХ НЕФТЕЙ НА МЕСТОРОЖДЕНИЯХ ТАТАРСТАНА

Рифхат З.Сахабутдинов, ¹Фаат Р. Губайдулин, ¹Алексей Н.Шаталов, Р. Мухаметгалеев

ТатНИПИнефть ОАО «Татнефть», г. Бугульма, Россия; ОАО «Татнефть», г. Альметьевск, Россия

HIGH-VISCOSITY HYDROGEN SULFIDE-BEARING OILS TREATMENT IN TATARSAN FIELDS

¹Rifhat Z. Sakhabutdinov, ¹Foat R. Gubaidullin, ¹Aleksei N. Shatalov, ²Radik R. Mukhametgaleev

¹TatNIPIneft of JSC “Tatneft”, Bugulma, Russia; ²JSC “Tatneft”, Almetyevsk, Russia

11

НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ БЕСЩЕЛОЧНОЙ ДЕМЕРКАПТАНИЗАЦИИ

НЕФТИ И ГАЗОВОГО КОНДЕНСАТА НА ОСНОВЕ КАТАЛИЗАТОРА «MARC»

NEW ALKALI-FREE TECHNOLOGY FOR SWEETENING CRUDE OILS AND HYDROCARBON FRACTIONS USING THE CATALYST MARC

Хамит Сарсеневич Мерпейсов, АО «КаспийНефтьТМЕ», г. Актобе, Республика Казахстан

Исиченко Игорь Валентинович, Коновалов Алексей Владимирович

DARVILLE ENTERPRISES LTD, Limassol, Cyprus

25

ПРИРОДНЫЙ СОРБЕНТ НА ОСНОВЕ ЖЕЛЕЗОМАНГАНЦЕВЫХ КОМПЛЕКСОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОПУТНОГО НЕФТЯНОГО ГАЗА

Наиля Г.Бажирова¹, Радик Р.Садыков¹, Алсу А.Закирова¹, Азат Ф.Вильданов¹, Ахмет М.Мазгаров¹, Владимир Б.Коптенармусов², Анатолий В.Полоник²

ОАО «ВНИИУС», г.Казань, ²ООО «НПО «Диомар», г. С.-Петербург

NATURAL SORBENT BASED ON IRON_MANGANESE COMPLEXES FOR TREATING ASSOCIATED OIL GAS

Nailya G.Bazhirova¹, Radik R.Sadykov¹, Alsu A.Zakirova¹, Azat F.Vildanov¹, Akhmet M.Mazgarov¹

Vladimir B.Koptenarmusov², Anatoly V.Polonik², J.S.C. “VNIUS”, Kazan, ² “NPO “DIOMAR” Ltd

31

СТЕЛСОГРАФИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ НА ДОКУМЕНТЫ В WWW

Игорь В. Минин, Олег В. Минин, Николай Е. Герасимов

Новосибирский Государственный Технический Университет, кафедра «Защиты информации»
пр. Карла Маркса, д.20, Новосибирск — 630092, Россия. E-mail: prof.minin@gmail.com

STEALTHOGRAPHIC PROTECTION OF INTELLECTUAL PROPERTY IN THE WWW DOCUMENTS

Igor V. Minin, Oleg V. Minin, Nikolay E. Gerasimov

Novosibirsk State Technical University, department of information security pr.Karla Marksa 20, Novosibirsk — 630092, Russia. E-mail: prof.minin@gmail.com

39

ПРОБЛЕМЫ БИОТЕХНОЛОГИИ КЛЕТОК НЕРВНОЙ ТКАНИ: ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ ФАКТОРОВ ТРОФИЧЕСКОГО ХАРАКТЕРА

Виталий Н. Никандров, Ольга Н. Жук, Раиса И. Гронская, Елена Ф. Полукошко, Нелли С. Пыжова,
Галина П. Петрусенко, Алеся А. Романовская

Институт физиологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 28 Минск 220072 БЕЛАРУСЬ

THE PROBLEMS OF BIOTECHNOLOGY OF NERVOUS TISSUE CELLS: THE RESEARCH OF THE PROTEIN FACTORS OF TROPHIC CHARACTER

Vitaly N. Nikandrov, Olga N. Zhuk, Raisa I.Gronskaya, Helena F. Polukoshko, Nelly S. Pyzhova, Halina P.
Petrusenko, Alesya A. Romanovskaya

Institute of Physiology of NAS of Belarus, Akademicheskaya str. 28, Minsk 220072 BELARUS

48

INVESTIGATION OF PROPERTIES OF HOLLOW AND LOW STRENGTH CONCRETE MASONRY UNITS WITH PUMICE AGGREGATE

Osman ÜNAL, Tayfun UYGUNOĞLU, Construction Department, Technical Education Faculty, Afyon
Kocatepe University, 03200 Afyonkarahisar / Turkey

67

THE SORPTION OF WATER VAPOUR OF ELM WOOD CHEMICALLY MODIFIED WITH ACETIC OR MALEIC ANHYDRIDE

Antonios Papadopoulos, Ioannis Takos and Dimitrios Emmanouloudis

Technological Educational Institute of Kavala, Department of Forestry and Management of Natural
Environment, 66100, Drama, Greece. E-mail antonios1974@hotmail.com, antpap@teikav.edu.gr

75

ACRYLIC ACID GRAFTED PDMS PRELIMINARY ACTIVATED BY AR+ BEAM PLASMA AND CELL OBSERVATION

A. Kostadinova* I. Keranov N. Zaekov*

*Institute of Biophysics, BAS, 1113 Sofia, Bulgaria

Department of Polymer Engineering, University of Chemical Technology
and Metallurgy (UCTM), 8 Kliment Ohridski Blvd., 1756 Sofia, Bulgaria

83

ИЗПОЛЗВАНЕ НА ДИСПЕРСИОННИ ПОЛИВИНИЛАЦЕТАТНИ ЛЕПИЛА ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА ОБЛИЦОВАНИ ОГЪНАТИ МЕБЕЛНИ ЕЛЕМЕНТИ

Панайот А. Панайотов, Стефан В. Хиков

Лесотехнически Университет, Бул. Климент Охридски №10, 1756 София

DISPERSION PVA GLUE UTILISATION FOR MANUFACTURING ON FACED BENDED FURNITURE ELEMENTS

Panayot A. Panayotov, Stefan V. Hikov, University of Forestry, 10 Kliment Ohridski Bulv. 1756 Sofia

88

ЕВРОПЕЙСКА КЛАСИФИКАЦИЯ НА ЛЕПИЛАТА ЗА ДЪРВЕСИНА

Панайот Ангелов Панайотов, Лесотехнически Университет, 1756 София, бул.Климент Охридски № 10

EUROPIAN CLASSIFICATION OF WOOD ADHESIVES

Panayot Angelov Panayotov, University of forestry, 1756 Sofia, 10 Kliment Ohridski Bulv.

98

ПРЕНОС НА ГЛАСОВА ИНФОРМАЦИЯ В ИНТЕРАКТИВНИ КАБЕЛНИ ТЕЛЕВИЗИОННИ МРЕЖИ

Красен К. Ангелов, Наталия А. Върбанова, Кирил Р. Койчев, Станимир М. Садинов

Технически университет – Габрово, ул. “Хаджи Димитър” №4, 5300 Габрово, България

TRANSMISSION OF VOICE CONTENT OVER INTERACTIVE CABLE TELEVISION NETWORKS

Krasen K. Angelov, Natalia A. Varbanova, Kiril R. Koitchev, Stanimir M. Sadinov

Technical University – Gabrovo, 4 H. Dimitar str., 5300 Gabrovo, Bulgaria

107

ОТНОСНО ВЪЗМОЖНОСТИТЕ ЗА ДОСТАВКА НА IP-БАЗИРАНИ TRIPLE PLAY УСЛУГИ В ХИБРИДНИ ОПТИЧНО-КОАКСИАЛНИ КАБЕЛНИ ТЕЛЕВИЗИОННИ МРЕЖИ

Красен К. Ангелов, Кирил Р. Койчев, Наталия А. Върбанова, Станимир М. Садинов

Технически университет – Габрово, ул. “Хаджи Димитър” №4, 5300 Габрово, България

ABOUT POSSIBILITIES OF DELIVERING OF IP-BASED TRIPLE PLAY SERVICES OVER HYBRID FIBRE-COAXIAL CABLE TELEVISION NETWORK

Krasen K. Angelov, Kiril R. Koitchev, Natalia A. Varbanova, Stanimir M. Sadinov

Technical University – Gabrovo, 4 H. Dimitar str., 5300 Gabrovo, Bulgaria

117

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВУЛКАНИЗАТИ В УСЛОВИЯТА НА МЕХАНИЧНИ НАТОВАРВАНИЯ И АГРЕСИВНИ СРЕДИ

Александър С. Александров, Гюнай Б. Халил, Климент Б. Хаджов

Химикотехнологичен и Металургичен Университет, Катедра “Приложна механика” бул.Кл.Охридски №8, 1756 София

INVESTIGATION OF MECHANICALLY LOADED RUBBERS SURROUNDED BY AGGRESSIVE MEDIA

Alexander S. Alexandrov, Giunai B.Hallil, Kliment B.Hadjov

University of Chemical Technology and Metallurgy, dep. Applied Mechanics,

blv.Kl.Ohridski 8, 1756 Sofia, Bulgaria

135

TEMPERATURE SCHEMES WITH FUZZY MODEL PREDICTIVE CONTROL FOR POLYMER REACTOR

Vassiliy A. Chitanov, Technical University-Branch Plovdiv

148

CEREAL BREEDING AT THE INSTITUTE OF AGRICULTURE “OBRAZTSOV CHIFLIK”- RUSE, BULGARIA: I. OAT SITUATION AND PERSPECTIVES

Galina Panayotova, Institute of Agriculture and Seed Science “Obraztcov chiflik” – Ruse, Bulgaria

156

21-^В ВЕК И РАБОТНАТА СРЕДА НА УНИВЕРСИТЕТСКИЯ ПРЕПОДАВАТЕЛ

Даниела Ал. Белкинова, Университет “Ангел Кънчев” Русе, ул.”Студентска” 8,

E-mail: dbelkinova@ru.acad.bg

21. CENTURY AND THE WORK ENVIRONMENT FOR THE LECTURER IN THE UNIVERSITY

Daniela Belkinova, University “Angel Kanchev” Ruse, Studentska Str. 8

163

АКЦЕНТИ ПРИ ИЗПОЛЗВАНЕ НА 2-D CAD СИСТЕМА В ДИСЦИПЛИНАТА “КОМПЮТЪРНА ГРАФИКА”

Даниела Ал. Белкинова, Университет “Ангел Кънчев” Русе, ул.”Студентска” 8

ACCENTS FROM USE OF THE 2-D CAD SYSTEM IN THE COMPARTMENT "COMPUTERGRAPHIK"

Daniela Belkinova, University “Angel Kanchev” Ruse, Studentska Str. 8

176

НЯКОИ НАЧИНИ ЗА ТЪРСЕНЕ НА ТРАНСФОРМАЦИИ НА СГЛОБЕНА ЕДИНИЦА

Михаил Н. Лепаров, Технически университет-София, 1000 София, бул. “Климент Охридски” 8

SOME WAYS TO SEARCH FOR TRANSFORMATIONS OF ASSEMBLY UNIT

Michail N. Leparov, Technical University- Sofia, 8, Kliment Ohridski Blvd.

1000 Sofia

185

ПО ВЪПРОСА ЗА МЕТОДИ ЗА РЕШАВАНЕ НА ЕВРИСТИЧНИ ЗАДАЧИ

Михаил Н. Лепаров, Технически университет- София, 1000 София, бул. “Климент Охридски” 8

ABOUT SOME METHODS TO RESOLVE HEURISTIC PROBLEMS

Michail N. Leparov, Technical University- Sofia, 8, Kliment Ohridski Blvd.

1000 Sofia

196

БИОСЕНСОРНАЯ ИЗМЕРИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ АНАЛИЗА И КОНТРОЛЯ ВОДНОЙ СРЕДЫ

Денис Н. Жданов, Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова

656038, Россия, Алтайский край, г. Барнаул, проспект Ленина 46, кафедра ИТ

BIOSENSOR MEASUREMENT SYSTEM FOR THE ANALYSIS AND CONTROL OF THE WATER ENVIRONMENT

Denis N. Zhdanov, Altai State Technical University by the name I.I. Polzunov

656038, Russia, Altai region, city Barnaul, avenue Lenin 46, the chair IT

204

НАРОДНИ И АВТОРИЗИРАНИ ПРИКАЗКИ В УЧЕБНИЦИТЕ ПО ЛИТЕРАТУРА ЗА ПЪРВИ-ЧЕТВЪРНИ КЛАС – РЕЦЕПЦИЯ И МЕТОДИЧЕСКИ ИНОВАЦИИ

Маргарита Т. Терзиева, Университет “Проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас

FOLK AND AUTHORED TALES IN LITERATURE TEXTBOOKS FOR GRADES 1-4: RECEPTION AND METHODOLOGICAL INNOVATIONS

Margarita T. Terzieva, Prof. Dr Assen Zlatarov University, Burgas, 8000, Bulgaria

235

СЛЕТИТЕ КЛАСОВЕ В СПЕЦИАЛИЗИРАНАТА ПЕДАГОГИЧЕСКА ЛИТЕРАТУРА И ПЕРИОДИЧЕН ПЕЧАТ ПРЕЗ XX ВЕК

Маргарита Терзиева, Университет “Проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас

MIXED CLASSES IN SPECIALISED PEDAGOGIC LITERATURE AND PERIODICALS IN THE 20TH CENTURY

Margarita Terzieva, Prof. Dr Assen Zlatarov University, Burgas, 8000, Bulgaria

244

ПСИХОЛОГИЧЕСКИЯТ ДИЗАЙН В ТЕОРИЯТА ЗА ЕСТЕТИЧЕСКО ВЪЗПИТАНИЕ НА ДЕЦАТА ОТ ПРЕДУЧИЛИЩНА ВЪЗРАСТ

Елка К. Янакиева, ЮЗУ „Неофит Рилски” – Благоевград

PSYCHOLOGICAL DESIGN IN THE THEORY FOR AESTHETIC EDUCATION OF PRE-SCHOOL CHILDREN

Elka K. Yanakieva, South-West University “Neofit Rilski” – Blagoevgrad

250