

**Министерство здравоохранения Республики Беларусь
Белорусская медицинская академия последипломного образования**

**ГУМАНИЗАЦИЯ ОБУЧЕНИЯ СПЕЦИАЛИСТОВ
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ**

**Материалы научно-практического
семинара с международным участием**

**Республика Беларусь, Минск
14-15 ноября, 2006**

**Минск
«Проспектплюс»
2006**

**Исследования на культурах клеток и тканей:
роль звеньев протеолиза в физиологии и патологии клетки**

В.Н. Никандров, Ин-т физиологии НАН Беларуси, Минск

Выбор объекта исследования – вопрос не только методический, но и идеологический, определяемый тем, какая задача решается в ходе эксперимента. Как бы то ни было, основу практически всех организмов составляют клетки. Поэтому, когда во главу угла ставят механизмы регуляции процессов жизнедеятельности на клеточном, межклеточном и субклеточном уровнях, одной из наиболее предпочтительных моделей является культура ткани или клеток.

Разумеется, если преследуются цели изучения патогенеза заболевания, обоснования путей его лечения, то без экспериментов на животных не обойтись. Однако в силу функционально-метаболической специфики биологических видов (и даже пород, линий), экстраполяция полученного экспериментального материала на организм человека или крупных сельскохозяйственных животных, конечно же, имеет пределы и должна вестись с осторожностью.

Культуры ткани различают гистотипические или органные, диссоциированные и перевиваемые. Каждая из них имеет особенности, преимущества или ограничения [1]. Работа на органотипических и диссоциированных культурах сопряжена с необходимостью использования некоторого числа лабораторных животных, боенского или биопсийного материала.

Наиболее употребительны культуры тканей при исследовании гистогенеза и его направленной регуляции, что важно при регенерации тканей, их трансплантации, особенно когда речь идет о высококодифференцированных тканях, при изучении регуляторных механизмов на клеточном уровне (например, рецепторов цитоплазматической мембраны). Культуры тканей используются при тестировании

и биологической индикации соединений природных или синтетических (например, оценка биологической активности фактора роста нервов – NGF ведется на перевиваемой культуре феохромоцитомы крысы PC12, клетки которой под действием этого белка трансформируются в нейрноподобные, а токсичность дифтерийного токсина определяют на культуре одной из линий клеток яичника китайского хомячка). На культурах клеток можно наблюдать пролиферацию опухолевых клеток и их регрессию, изучать особенности внутриклеточного метаболизма, трансформацию соединений биологической и химической природы, биологию внутриклеточного паразитизма, в частности, репродукцию вирусов. Культуры клеток также достаточно широко используются в биотехнологии. С использованием культур клеток получают вирусные вакцины (противокоревую, полиомиелитную и т.д.), антитела, интерфероны (фибробластный и лимфобластный), энзимы, гормоны, факторы роста. Одной из примечательных разработок своего времени была экспериментальная технология получения тканевого активатора плазминогена из культуры клеток Bowes меланомы человека. В последние годы прогрессирует генно-инженерная технология получения животных белков путем микробного синтеза, однако это не всегда возможно, т.к. необходимо воспроизведение систем посттрансляционного процессинга. Наконец, предприняты попытки использования культуры тканей для трансплантации. Это касается и таких высокодифференцированных тканей, как нервная или ткань миокарда [2]. Однако в данном случае имеется ряд сложностей обеспечения специфической трофической поддержки трансплантата.

Естественно, что масштабное использование культур клеток в биотехнологии и для исследовательских целей требует хорошо организованного процесса наработки этих культур.

В Беларуси история развития культур ткани затрагивает два научных учреждения. В Институте физиологии НАН Беларуси в конце 60-х-начале 70-х гг. было начато культивирование нервной ткани (органотипические и диссоциированные) для изучения молекулярно-клеточных основ патологии и гистогенеза. Организатором этих работ был Б.Я. Вильнер, под непосредственным руководством которого осуществлено получение органных и диссоциированных культур ганглиев симпатических, спинальных, тригеминальных ганглиев, гассерова узла, ткани спинного мозга, надпочечников, сокультивирование нервной и мышечной ткани, начата работа по получению культуры ткани сердца. Впоследствии сотрудниками лаборатории регуляторных белков и пептидов велись работы на клетках феохромоцитомы PC12, когда под руководством проф. В.Н. Калюнова изучались свойства фактора роста нервов (NGF). В последние годы начаты также исследования на культурах ткани коры головного мозга, перевиваемых клетках крысиной глиомы С6 и человеческой нейробластомы IMR-32.

С другой стороны, масштабная наработка культур тканей, главным образом, перевиваемых, была организована в 60-х-70-х гг. по инициативе академика АМН СССР В.И. Вотякова на предприятии по производству бакпрепаратов Белорусского НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава БССР. В отделении культур клеток, которое на протяжении двух десятилетий возглавляла Засл. врач БССР Л.И. Никонович, осуществлялась поточная наработка клеток перевиваемых ли-

ний, а также первичных (ФЭК, почка человека, мышца эмбриона человека). Была организована также наработка отечественной питательной среды на основе получаемых гомогидролизатов и сыворотки крови для культур ткани. Хотя все это производство было ориентировано для нужд, прежде всего, вирусологии, данные культуры позволяли проводить разнообразные исследования и в других областях медико-биологических наук. В настоящее время мы не имеем столь масштабной наработки культур тканей. Культивирование ряда перевиваемых линий клеток ведется и в Институте экспериментальной ветеринарии НАН Беларуси. Однако нынешние масштабы далеки от тех, которые были 20-25 лет назад.

С 1999 г. в лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси, на базе авторской концепции кислородзависимого пути активации плазминогена [3], начат комплекс исследований роли реакций перичеселлюлярного протеолиза, в частности, звена «плазминоген-плазмин» в жизнедеятельности клеток нервной ткани и при воздействии повреждающих факторов, включая нейродегенерацию при дисбалансе звена NH_4 -глутамат. Проиллюстрируем конкретно возможности культуры ткани в решении такой сложной и многогранной проблемы.

За восемь лет сотрудниками лаборатории (О.Н. Жук, Г.П. Петрусенко, Р.И. Гронской, Е.Ф. Полукошко, И.Б. Лукашевич, А.А. Романовской, М.К. Тумилович) с помощью электронной, световой микроскопии и биохимических методов получены следующие пионерские данные, установлены следующие закономерности [4-11 и др.]:

- показано трофическое действие плазминогена или стрептокиназы на органические культуры симпатических ганглиев, плазминогена – на развитие клеток в культуре неокортекса, глиомы С6, а стрептокиназы – на диссоциированные культуры спинальных ганглиев (при этом резко возрастало число шванновских клеток на отростках нервных клеток);

- установлено защитное действие предобработки плазминогеном и стрептокиназой при повреждениях клеток $0,0005 \text{ M H}_2\text{O}_2$ (культуры симпатических ганглиев, глиомы С6, феохромоцитомы РС12), $0,1 \text{ M NH}_4\text{Cl}$ (культуры симпатических ганглиев, феохромоцитомы РС12), $0,0001 \text{ M}$ глутаматом (неокортекс, симпатические ганглии, чувствительные спинальные ганглии), $0,001 \text{ M}$ АТФ в анионной форме (неокортекс), при воздействии «холодового стресса» (спинальные ганглии);

- продемонстрированы заметные, порой очень резкие изменения внутриклеточного АТФ-активируемого и Ca^{2+} -активируемого протеолиза в клетках феохромоцитомы РС12 при кратковременной экспозиции со стрептокиназой (10^{-6} - $5 \cdot 10^{-10} \text{ M}$) или плазминогеном (10^{-7} - 10^{-10} M). Сдвиги, вызванные плазминогеном (но не стрептокиназой), в значительной степени нивелировались при одновременном внесении NGF;

- показана деструкция межклеточного матрикса (чувствительные спинальные ганглии);

- выявлены существенные изменения уровня ДНК, РНК и белка в клетках глиомы С6 при действии плазминогена или стрептокиназы в концентрации 10^{-7} - 10^{-9} M .

Эти материалы иллюстрируют прямое, не опосредованное кровотоком действие указанных белков на клетки нервной ткани – вопрос пока мало изученный, однако очень важный, учитывая способность микроглии и некоторых видов нейронов синтезировать плазминоген [12], а также наличие рецепторов к нему на поверхности клеток нервной ткани. В этом отношении особо стоит вопрос о действии стрептокиназы – аллогенного белка для животного организма, которое может проявляться в очень низких концентрациях.

В связи с назревшими проблемами трансплантации ткани миокарда в лаборатории были получены диссоциированные культуры ткани миокарда новорожденных крысят, а также первые положительные результаты по возможности культивирования кардиомиоцитов взрослых животных.

Наконец, в нынешнем году осуществлено культивирование ткани сонной артерии и начаты наработка монослойной культуры эндотелиоцитов (Р.И. Гронская, Е.Ф. Полукошко), а также работы по получению первичных культур ткани паращитовидной железы.

Полученные материалы легли в основу усовершенствований способов культивирования клеток нервной ткани и ткани сердца (подано 5 заявок на изобретения, на 3 уже получены положительные решения), они позволяют наметить направления дальнейших многоплановых исследований в этом аспекте, вносят вклад в представления о молекулярных механизмах регуляции процессов жизнедеятельности клеток нервной ткани. Более того, эти данные могут быть использованы для расшифровки механизмов патогенеза поражений нервной ткани, а в перспективе – для обоснования подходов и их коррекции, проработки вопросов нейрофармакологии и нейротрансплантации.

Литература:

1. *Культура животных клеток. Методы.* / Под ред. Р. Фрешни. Пер. с англ. – М., 1989. – 332 с.
2. Балашко С.И., Колядко А.Н., Лукашевич В.С. и соавт. // *Изв. НАН Беларуси: Сер. мед.-биол. наук*, 2003. – № 2. – С. 113-121.
3. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // *Изв. НАН Беларуси: Сер. мед.-биол. наук*, 2001. – № 1, – С. 54-60.
4. Никандров В.Н., Володкович О.И., Гронская Р.И. и соавт. // *Достижения мед. науки Беларуси: Вып. VII.* – Мн., 2002. – С. 49-50.
5. Никандров В.Н., Петрусенко Г.П., Гронская Р.И., Тумилович М.К. // *Изв. НАН Беларуси: Сер. мед.-биол. наук*, 2003. – № 2. – С. 54-58.
6. Никандров В.Н., Петрусенко Г.П., Гронская Р.И. // *Изв. НАН Беларуси: Сер. мед.-биол. наук*, 2003. – № 4. – С. 84-87.
7. Володкович О.И., Долгова Н.А., Лукашевич В.С., Никандров В.Н. *Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине.* // – Мн., 2004. – С. 67-69.
8. Никандров В.Н., Жук О.Н. // – Мн.: *Морфология*, 2005. – Т. 128. – № 5. – С. 33-36.
9. Никандров В.Н. // *Научные труды I съезда физиологов СНГ.* – Мн., 2005. – Т. 2. – 48 с.
10. Полукошко Е.Ф., Никандров В.Н. // *Сахаровские чтения 2005 года: экологические проблемы XXI века.* – Ч. I. – Мн., 2005, – С. 86-87.
11. Никандров В.Н., Романовская А.А. // *Сб. трудов междунар. конф. «Физико-химическая биология».* – Новосибирск, 2006. – 164 с.
12. Kohsaka Sh., Hamanoue M., Nakajima K. // *Keio J. Med.*, 1996. – Vol. 45. – № 3. – P. 263-269.

СОДЕРЖАНИЕ

Приветствие участникам семинара от Национального Комитета по биоэтике Республики Беларусь. <i>Ф.И. Висмонт</i> , зам. председателя НКБЭ	3
Приветствие участникам семинара от Белорусской медицинской академии последиplomного образования. <i>В.С. Камышников</i> , проректор БелМАПО	5
Приветствие участникам семинара от Белорусского государственного медицинского университета. <i>С.Д. Денисов</i> , 1-й проректор БГМУ	7
1. Гуманное и эффективное обучение наукам о жизни. <i>Ник Джукс</i> , InterNICHE (Великобритания), <i>Елена Маруева</i> , Центр защиты прав животных «Вита» (Россия)	9
2. Национальный комитет по биоэтике Республики Беларусь: за гуманизацию обучения. <i>Я.С. Яскевич</i> , НКБЭ Республики Беларусь	22
3. Этико-гуманистические основания современного биомедицинского образования. <i>Т.В. Мишаткина</i> , НКБЭ Республики Беларусь	25
4. Биоэтическое образование будущих специалистов в Белорусском государственном медицинском университете. <i>С.Д. Денисов</i> , <i>С.П. Ярошевич</i> , БГМУ (Минск)	31
5. Процесс гуманизации обучения студентов БГМУ. <i>Т.С. Морозкина</i> , БГМУ (Минск)	34
6. Преподавание биомедицинской этики в системе последиplomного образования. <i>Т.В. Калинина</i> , <i>Г.Я. Хулуп</i> , БелМАПО (Минск)	40
7. Исследования на культурах клеток и тканей: роль звеньев протеолиза в физиологии и патологии клетки. <i>В.Н. Никандров</i> , Ин-т физиологии НАН Беларуси (Минск)	42
8. Иммунологические методы с применением культур клеток <i>in vitro</i> . <i>К.В. Лазнев</i> , ЦНИЛ БелМАПО (Минск)	46
9. Методологические подходы к изучению механизмов боли и соблюдение принципов биоэтики при работе с экспериментальными животными. <i>С.А. Руткевич</i> , <i>Т.П. Шухно</i> , БГУ (Минск)	46
10. Перспективы использования компьютерных программ в процессе гуманизации обучения в ЦНИЛ БелМАПО. <i>Т.В. Силич</i> , БелМАПО (Минск)	49
11. Проблемы использования животных в учебных физиологических экспериментах. <i>Н.П. Канунникова</i> , <i>Н.З. Башун</i> , ГрГУ им. Я.Купалы (Гродно)	51
12. Насколько оправдано массовое убийство животных? <i>Н.Е. Сляднева</i> , <i>А.А. Саварин</i> , ГГУ им. Ф. Скорины, газета «Мир животных» (Гомель)	53
13. Учебные альтернативы экспериментам на животных в преподавании патологической физиологии. <i>И.П. Меркулова</i> , МГЭУ им. А.Д. Сахарова (Минск)	55
14. Этические аспекты в преподавании физиологической дисциплины. <i>В.В. Зинчук</i> , <i>О.А. Балбатун</i> , ГрГМУ (Гродно)	57
15. Организация научного эксперимента с соблюдением основных принципов биоэтики. <i>Е.А. Римжа</i> , <i>А.В. Бокач</i> , ЦНИЛ БелМАПО (Минск)	58
16. Правила обращения с лабораторными животными. <i>Д.Н. Буко</i> , БелМАПО (Минск)	63
17. Гуманизация обучения студентов Гомельского государственного медицинского университета. <i>А. Н. Коваль</i> , ГГМУ (Гомель)	67
18. Гуманизация обучения зооинженеров в аграрных вузах Республики Беларусь. <i>Н.И. Гавриченко</i> , <i>Г.Ф. Медведев</i> , <i>И.А. Долин</i> , <i>М.М. Муртазаев</i> , <i>Д.С. Ходыкин</i> , БГСХА (Горки)	69
19. Альтернативные методы обучения студентов медико-биологических вузов. <i>М.Л. Жолнерович</i> , ВГАВМ (Витебск)	71
20. Гуманизация обучения студентов в вузе аграрного профиля. <i>Н.Н. Климов</i> , <i>Л.А. Танана</i> , <i>С.И. Коришун</i> , ГрГАУ (Гродно)	73
21. О проекте закона Республики Беларусь «Об обращении с животными». <i>Л.М. Логиновская</i> , <i>М.А. Пушкевич</i> , ООЗЖ «Зоосвет» (Минск)	75
ИТОГОВЫЙ ДОКУМЕНТ	77
Список сокращений	82