

ISSN 1680-6387

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай
АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ



Серыя
медыка-біялагічных
навуk

NEWS
OF BIOMEDICAL
SCIENCES

4

Мінск
“Беларуская навука”
2003

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай
АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫКА-БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК 2003 № 4

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК 2003 № 4

NEWS OF BIOMEDICAL SCIENCES

ЗАСНАВАЛЬНІК — НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Серия издается с января 2001 года

Выходит четыре раза в год

СОДЕРЖАНИЕ

К 75-летию Национальной академии наук Беларуси.....	5
ФИЗИОЛОГИЯ И ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ	
Андрианов В. В., Василюк Н. А. Влияние тревожности на вариабельность сердечного ритма испытуемых при решении сенсо-моторных задач при различном информационном восприятии.....	6
Азев О. А., Солтанов В. В. Электрофизиологический анализ путей проведения интероцептивных сигналов к нейронам вестибулярных ядер крысы.....	14
Белоенко Е. Д., Ильясевич И. А., Скакун П. Г., Сошникова Е. В., Кандыбо И. В. Механизмы нервно-мышечных и сосудистых изменений у больных при нарушении движений в плечевом суставе.....	18
Ильясевич И. А., Белоенко Е. Д., Мазуренко А. Н. Нейрофизиологические критерии состояния проводимости спинного мозга при осложненной травме нижнегрудного и поясничного отделов позвоночника.....	24
Жукова И. А., Амвросьев А. П. Особенности влияния внешнего длительного гамма-облучения в малой дозе на состояние гемокапилляров семенника плодов белой крысы.....	33
НЕЙРОМОРФОЛОГИЯ И НЕЙРОХИМИЯ	
Тропникова Г. К. Реакции серотонинергических структур мозга на системное введение эндотоксина после унилатерального разрушения ростральных участков ядра солитарного тракта.....	37
Емельянова А. А., Солтанов В. В. Особенности ультраструктуры дорсального моторного ядра блуждающего нерва продолговатого мозга крыс в условиях эндотоксемии.....	41
БИОХИМИЯ И ЭНДОКРИНОЛОГИЯ	
Логининец И. А., Бекиш О.-Я. Л. Состояние гипофизарно-тиреоидной системы при миграционном аскаридозе у крыс.....	45

Семак И. В., Корик Е. О., Наумова М. В., Сломински А. Взаимодействие продуктов пероксидазного окисления моно-, ди- и тригидроксифлавонов с глутатионом	50
Виноградова Т. А., Водоевич В. П., Ковальчук В. Г., Слободская Н. С., Гуринович В. А., Виноградов В. В. Гормональный профиль крови крыс и протекторная роль тиамин при иммобилизационном стрессе	57
Корик Е. О., Наумова М. В., Сломински А., Семак И. В. Возможные механизмы образования глутатионовых конъюгатов кверцетина и рутина	62
Кириллов В. А., Стебеньева Е. Е., Пацлевка А. А., Демидчик Е. П. Диагностика тиреоидного рака с помощью морфометрической оценки изменений популяции лимфоидных клеток ткани щитовидной железы	68
Макарчиков А. Ф., Русина И. М. Выделение, очистка, физико-химические и кинетические свойства минорной формы тиаминтрифосфатазы из почек быка	76
Лойко Е. Н., Самаль А. Б. Влияние H ₂ O ₂ на АДФ-индуцированную агрегацию и Ca ²⁺ -ответ тромбоцитов и их дезагрегацию	80
Никандров В. Н., Петрусенко Г. П., Гронская Р. И. Состояние АТФ- и Ca ²⁺ -зависимого протеолиза в клетках феохромоцитомы РС12 при действиях стрептокиназы и фактора роста нервов	84
ВИРУСОЛОГИЯ, МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ	
Щупакова А. Н., Лигвяков А. М. Вирус простого герпеса и периферический атеросклероз	88
Морозевич Т. А., Семененя И. Н. Влияние тренировочного процесса на содержание иммуноглобулинов в слюне у спортсменов	92
Ермолович М. А., Самойлович Е. О., Фельдман Э. В. Молекулярно-биологический анализ полновирусов, изолированных от больных вакцино-ассоциированным полиомиелитом в Беларуси	95
БИОФИЗИКА И БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ	
Тепляков А. И., Прищепова Е. В., Акулич Н. В., Теплякова Д. В., Кручинский Н. Г. О роли цитокинов и молекул клеточной адгезии в патогенезе атеросклероза у людей, подвергшихся радиационному воздействию, которые проживают на территории, загрязненной радионуклидами	102
Сергейчик Н. Л., Жаворонок С. В., Тарасюк И. В. Выделение нейроспецифического белка группы S100B и создание иммуноферментного диагностического набора для выявления антител к нему	109
Лобко Н. Ф., Гаврилов В. Б., Конев С. В. Тирозинсодержащие пептиды — новый индикатор эндогенной интоксикации организма	114
Арчакова Л. И., Гуринович В. Н., Емельянова А. А., Сердюченко Н. С., Новаковская С. А. Изменение ультраструктуры поврежденной субхондральной кости при действии низкоинтенсивного лазерного и магнитолазерного облучения	120
МЕДИЦИНСКАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА	
Красковский Г. В., Миронова Г. И., Росецкая С. Д., Липская М. В. Влияние иммунизации онкотолерогеном и яичным альбумином на рост гомологичных и негомологичных онкотолерогену опухолей	125
Огурцова С. Э., Трусова В. Д., Крушова Э. В., Войтович А. М., Афонин В. Ю. Влияние индуктора монооксигеназ t-бутилгидрохинона на мутагенный эффект ряда противоопухолевых лекарств в клетках костного мозга мышей	132
ОБЗОРЫ	
Наумова М. В., Корик Е. О., Семак И. В., Кульчицкий В. А. Роль монооксида азота в механизмах повреждения печени (биохимический аспект)	135
Фельдман Э. В., Самойлович Е. О., Вотяков В. И., Титов Л. П. Полиомиелит в Беларуси: достижения и проблемы профилактики заболевания живой оральной вакциной	140
ХРОНИКА	
Андрей Георгиевич Мойсеев (К 60-летию со дня рождения)	146

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ 2003 № 4

Серия медико-биологических наук

на русском, белорусском и английском языках

Тэхнічны рэдактар Т. В. Л е с ц ь е н

Комп'ютарная вёрстка С. М. К а с ц ю к

Зладзена ў набор 25.09.2003. Падысана ў друк 03.12.2003. Выхад у свет 15.12.2003. Фармат 60×84¹/₈. Папера афсетная. Афсетны друк. Ум. друк. арк. 17,67. Ум. фарб.-адб. 18,6. Ул.-выд. арк. 19,5. Тыраж 299 экз. Заказ 2794.

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства «Выдавецтва «Беларуская навука». ЛВ № 13 ад 31.12.2002 г. 220141. Мінск, Старабарысаўскі тракт, 40. Пасведчанне 457.

Рэспубліканскае ўнітарнае паліграфічнае прадпрыемства «Баранавіцкая ўзбуйненая друкарня». ЛП № 122 ад 30.12.2002 г. 225409. Баранавічы, Савецкая, 80.

УДК 576.38:577.152.34

В. Н. НИКАНДРОВ, Г. П. ПЕТРУСЕНКО, Р. И. ГРОНСКАЯ

**СОСТОЯНИЕ АТФ- И Ca^{2+} -ЗАВИСИМОГО ПРОТЕОЛИЗА В КЛЕТКАХ
ФЕОХРОМОЦИТОМЫ РС12 ПРИ ДЕЙСТВИЯХ СТРЕПТОКИНАЗЫ
И ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ***Институт физиологии НАН Беларуси, Минск**(Поступила в редакцию 27.08.2003. Принята после рецензирования 28.08.2003)*

Как было уже отмечено в предыдущей статье [1], система «плазминоген-плазмин» («Pg-Pl») играет важную роль в жизнедеятельности клеток нервной ткани. При этом, синтез Pg в нервной ткани автономен и осуществляется в микроглии [2]. Таким образом, нервные клетки, в целом, не зависят от поступления зимогена из кровотока. Указанная система включает до 10 белков (в т. ч. активаторы Pg, ингибиторы активаторов и ингибиторы Pl) и характеризуется определенной иерархией. Роль Pg — ключевого компонента системы пока остается недостаточно ясной. Показано, что Pg промотирует развитие мезенцефальных дофаминергических нейронов, модулирует состояние NMDA-рецепторов на нейронах гиппокампа, обладает защитным действием на клетки симпатических вегетативных ганглиев при влиянии повреждающих факторов и на клетки феохромоцитомы РС12 [3–5].

Существенно большая информация в литературе имеется о роли активаторов Pg для жизнедеятельности клеток нервной ткани [например, 6]. Однако эта информация касается лишь урокиназного и тканевого активаторов. Практически отсутствуют данные о влиянии на клетки нервной ткани одного из сильнейших активаторов Pg — стрептокиназы. Между тем, на понтобульбоспинальных препаратах мозга крысы установлено, что суперфузия раствором стрептокиназы ведет к возрастанию на 50–55% частоты генерации инспираторных залпов при некотором увеличении амплитуды низко- и среднечастотных разрядов [7], что отражает изменения состояния нейронов. Вместе с тем, о прямом метаболическом действии стрептокиназы на клетки (не опосредованном кровотоком и гемодинамическим звеном) практически нет данных, хотя этот вопрос нуждается в прояснении, что продиктовано медицинскими показаниями к применению лечебных препаратов стрептокиназы при ишемических инсультах, туберкулезных менингитах и т. д. [8].

Учитывая изложенное, а также полученные нами данные об изменении уровня АТФ- и Ca^{2+} -зависимого протеолиза при добавках в питательную среду Pg [1], в том числе в сочетании с фактором роста нервов (NGF), цель настоящей работы — изучение влияния стрептокиназы и ее комбинаций с фактором роста нервов на состояние указанных реакций протеолиза в клетках феохромоцитомы РС12.

Материалы и методы. Клетки феохромоцитомы РС12 культивировали на среде RPMI-1640, содержащей эмбриональную телячью и лошадиную сыворотки крови как подробно описано нами в предыдущей статье [1]. За сутки до эксперимента культуральную жидкость удаляли, клетки заливали свежей питательной средой, содержащей 0.5% сыворотки крови. Через 24 часа клетки феохромоцитомы снимали пипетированием, суспензию разводили питательной средой до концентрации 1 млн клеток в пробе (подсчет вели в камере Горяева). Затем в суспензию клеток вносили NGF в концентрации 10.0 или 100.0 нг/мл или стрептокиназу в концентрации 0.1, 1.0, 100.0, 1000.0 и 2000.0 МЕ/мл или же смесь этих двух белков в указанных концентрациях. В контрольные образцы указанные белки не добавляли. Через 20 мин суспензию клеток центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин, осадок замораживали, хранили при $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Определение уровня АТФ-активируемого и Ca^{2+} -активируемого внутриклеточного протеолиза проводили как подробно описано ранее [1].

Все исследования выполнены не менее, чем трехкратно. Результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента.

В работе использовали те же реактивы, что и в предыдущей статье [1]. Стрептокиназа была производства «Белмедпрепараты» (препарат «Стрептаза»).

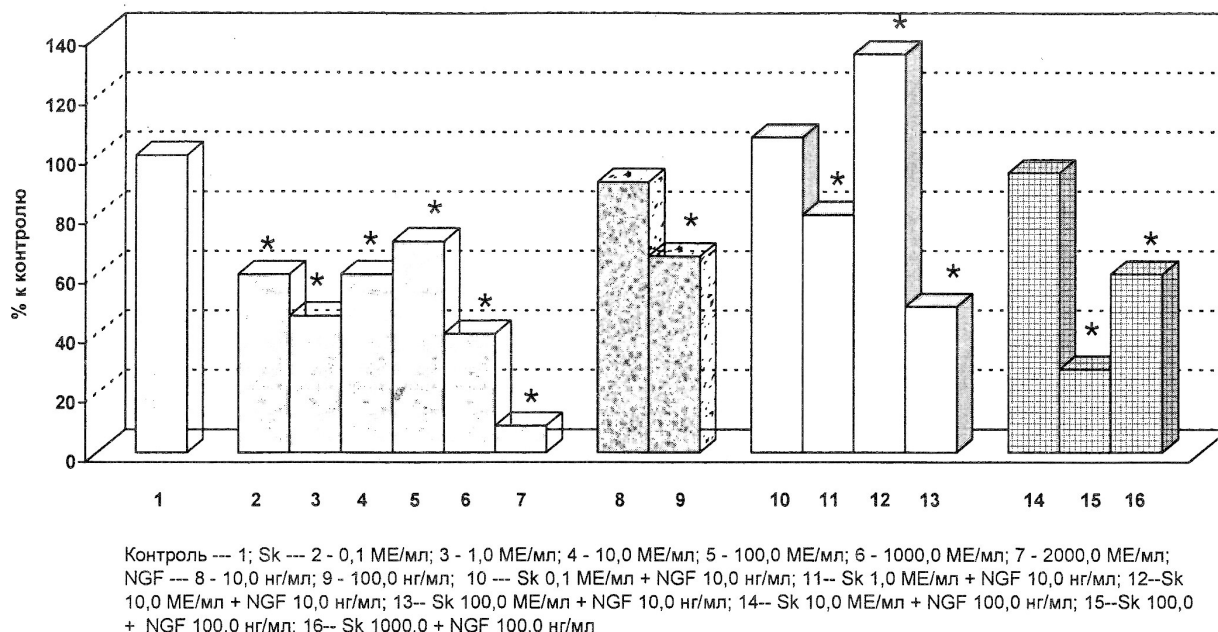


Рис. 1. Активность АТФ-активируемых протеиназ в клетках PC12 при раздельном и комбинированном внесении в среду инкубации стрептокиназы (Sk) и NGF: время инкубации 20 мин

Результаты и их обсуждение. Кратковременная экспозиция клеток феохромоцитомы со стрептокиназой вела к подавлению АТФ-активируемого протеолиза на 30–60%, а при концентрации стрептокиназы 2000.0 МЕ/мл — на 90% (рис. 1). Добавка в питательную среду одного NGF лишь при концентрации 100.0 нг/мл вызвала умеренное (на 35%) снижение уровня АТФ-активируемого протеолиза. При смешивании нейротрофина и стрептокиназы наблюдали следующую картину.

При концентрации нейротрофина 10.0 нг/мл снижение уровня АТФ-активируемого протеолиза, вызванное стрептокиназой в концентрации 0.1 или 1.0 МЕ/мл практически снималось. На фоне действия NGF увеличение концентрации стрептокиназы до 10.0 МЕ/мл вело к возрастанию интенсивности энергозависимого протеолиза в 1.3 раза. Вместе с тем, в варианте 100.0 МЕ/мл стрептокиназы + 10.0 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 10.0 МЕ/мл стрептокиназы практически не влияло на уровень АТФ-зависимого протеолиза, а при концентрации ее 100.0 или 1000.0 МЕ/мл обусловило уменьшение интенсивности этого протеолиза. Причем, эффект в случае концентрации стрептокиназы 100.0 МЕ/мл и 100.0 нг/мл NGF был близок к суммарному индивидуальных белков. При более высокой концентрации стрептокиназы в сочетании ее с нейротрофином степень угнетения (40%) не достигала эффекта одной стрептокиназы в этой концентрации (60%).

На активируемые Ca^{2+} в низких концентрациях (50 мкМ, кальпаин I) реакции протеолиза добавки стрептокиназы оказали, как правило, угнетающее действие (рис. 2). Причем, эффект стрептокиназы в низких концентрациях проявлялся заметно сильнее. Угнетение составило 75–80%. При концентрации же стрептокиназы 10.0 МЕ/мл экспозиция клеток PC12 сопровождалась даже тенденцией к росту указанной протеолитической активности. Добавка в питательную среду одного NGF только при концентрации 100.0 нг/мл вызвала изменение уровня I-кальпаиновой активности: возрастание на 45%. При сочетании же стрептокиназы и NGF практически во всех случаях отмечено снижение указанной активности в сравнении с контролем на 40–90%. Лишь в варианте стрептокиназа, 100.0 МЕ/мл + NGF, 10.0 нг/мл изменения со стороны I-кальпаиновой активности не превышали 16%. Примечательно, что добавление NGF в концентрации 10.0 нг/мл (само по себе не оказавшее влияния на I-кальпаиновую активность) достаточно заметно модифицировало эффект стрептокиназы: 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 100.0 нг/мл резко усиливало подавление I-кальпаиновой активности клеток феохромоцитомы стрептокиназой, в диапазоне концентрации 10.0–1000.0 МЕ/мл.

На активируемые Ca^{2+} в более высокой концентрации протеинезии (5 мМ, кальпаин II) добавки одного NGF влияния не оказали (рис. 3). Экспозиция клеток феохромоцитомы со

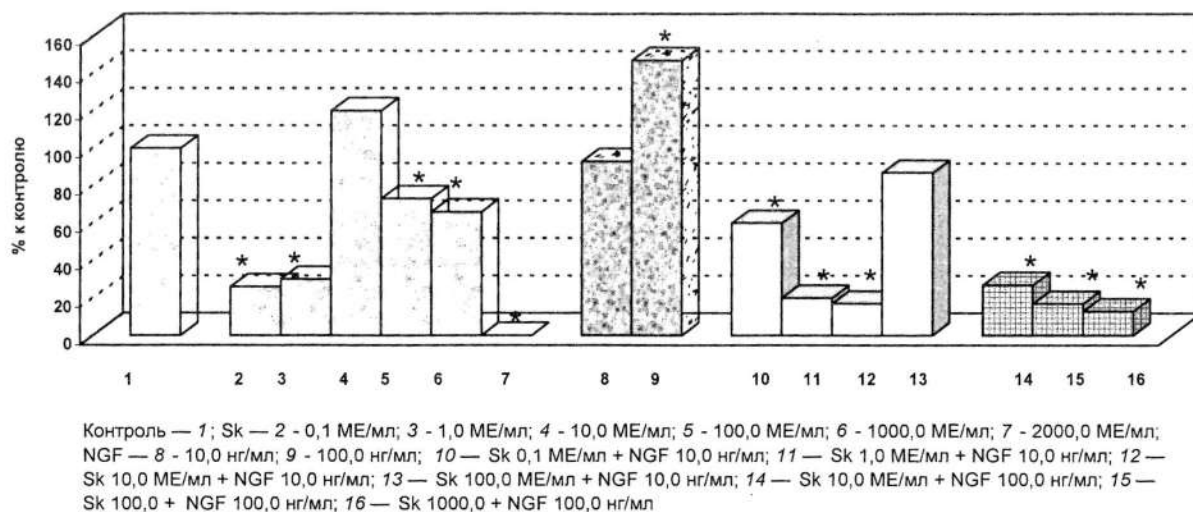


Рис. 2. Активность (I) Ca^{2+} -зависимых протеиназ в культуре клеток PC12 при раздельном и комбинированном внесении в среду инкубации Sk и NGF: время инкубации 20 мин

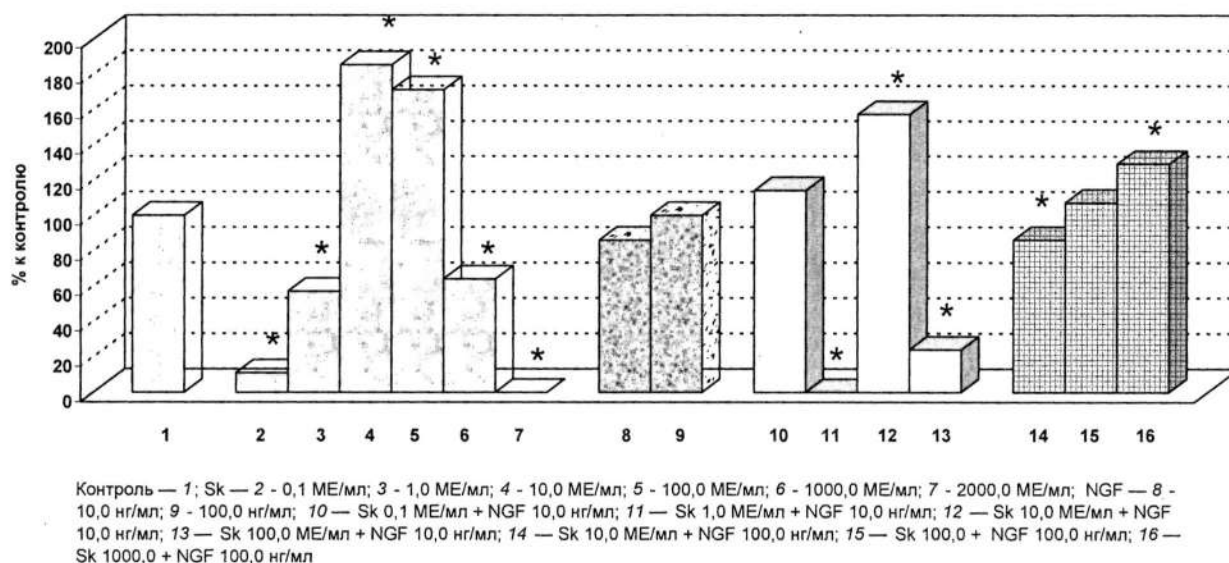


Рис. 3. Активность (II) Ca^{2+} -зависимых протеаз в культуре клеток PC12 при раздельном и комбинированном внесении в среду инкубации Sk и NGF: время инкубации 20 мин

стрептокиназой вызвала неоднонаправленный эффект в зависимости от концентрации этого активатора Pg: при концентрации стрептокиназы 0.1 и 1.0 МЕ/мл наблюдалось угнетение II-кальпаиновой активности на 90% и 45% соответственно. Увеличение ее концентрации до 10.0 и 100.0 МЕ/мл сопровождалось возрастанием II-кальпаиновой активности в 1.7—1.8 раза. Дальнейшее увеличение концентрации стрептокиназы до 1000.0 и 2000.0 МЕ/мл вело к подавлению данной протеолитической активности на 40% и 100% соответственно.

При смешивании стрептокиназы с NGF эффект ее изменялся существенно, сложным неоднонаправленным образом. В концентрации 10.0 нг/мл NGF практически снимал ингибиторное действие стрептокиназы в концентрации 0.1 МЕ/мл, но резко усиливал это действие при концентрации ее 1.0 МЕ/мл — до 100%. Характер действия стрептокиназы при концентрации 10.0 МЕ/мл в присутствии 10.0 нг/мл нейротрофина фактически не менялся, тогда как увеличение ее концентрации до 100.0 МЕ/мл в этих условиях вело к подавлению II-кальпаиновой активности на 80%. В сочетании же с NGF в более высокой концентрации (100.0 нг/мл) стимулирующее II-кальпаиновую активность действие стрептокиназы не проявлялось. Также снималось полностью и подавление данного типа протеолитической активности, наблюдавшееся при действии одной стрептокиназы в концентрации 1000.0 МЕ/мл.

Принимая среднюю величину молекулярной массы стрептокиназы равной 50 кДа, и с учетом удельной активности образцов стрептокиназы 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 стрептокиназа — аллогенный для феохромоцитомы 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 [1], добавление к культуре феохромоцитомы стрептокиназы вело к угнетению АТФ-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 стрептокиназы, хотя в ряде вариантов степень подавления АТФ-активируемого протеолиза при действии стрептокиназы с NGF была меньшей, чем в случае одной стрептокиназы.

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

В отличие от Pg [1], экспозиция клеток PC12 со стрептокиназой вызвала более сложный «куполообразного» типа характер зависимости «эффект-концентрация» в случае II-кальпаиновой активности. Вместе с тем, сочетание стрептокиназы с NGF чаще сопровождалось уменьшением эффекта стрептокиназы, хотя в отдельных вариантах наблюдалось резкое изменение направленности сдвигов этого типа протеиназной активности.

Как и в случае с плазминогеном, в настоящее время мы не располагаем какими-либо данными для объяснения сложного характера вызываемых стрептокиназой изменений. Это задача дальнейших исследований. Вместе с тем, полученные результаты практически впервые демонстрируют прямое, непосредственное энзимными системами кровотока, действие стрептокиназы на процессы внутриклеточного метаболизма. При этом, воздействие стрептокиназы не вызывало гибели клеток или изменений их морфологии при прижизненной световой микроскопии.

Литература

1. Никандров В. Н., Петрусенко Г. П., Гронская Р. И., Тумилович М. К. // Известия НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. 2003. № 2. С. 54–58.
2. Nakajima K., Tsuzaki N., Nagata K., Takemoto N., Kohsaka Sh. // FEBS Lett. 1992. Vol. 308, N 2. P. 179–182.
3. Nagata K., Nakajima R., Kohsaka Sh. // Dev. Brain Res. 1993. Vol. 75. P. 31–37.
4. Inoue K., Koizumi Sh., Nakajima K., Hamanoue M., Kohsaka Sh. // Neurosci. Lett. 1994. Vol. 179. P. 87–90.
5. Никандров В. Н., Петрусенко Г. П., Жук О. Н., Полукошко Е. Ф., Володкович О. И., Лукашевич И. Б., Гронская Р. И., Шпак Г. А., Тумилович М. К., Пыжова Н. С. // Достижения медицинской науки Беларуси. Вып. VII. Минск, 2002. С. 49–50.
6. Strickland S., Gualandris A., Rogove A. D., Tsirka S. E. // Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology. Cold Spring Harbour, 1996. Vol. 61. P. 739–745.
7. Никандров В. Н., Пятин В. Ф., Алексеева А. С., Мирошниченко И. В., Якунина О. В., Новоселова А. М., Гаркун Ю. С., Мурашко О. Н., Кульчицкий В. А. // Известия НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. 2003. № 2. С. 40–43.
8. Fletcher A. P. // J. Clin. Invest. 1954. Vol. 33, N 1. P. 69–76.

V. N. NIKANDROV, G. P. PETRUSENKO, R. I. GRONSKAYA

THE STATE OF ATP- AND Ca^{2+} -DEPENDENT PROTEOLYSIS IN PHEOCHROMOCYTOMA PC12 CELLS UNDER ADDITIONS OF STREPTOKINASE AND NERVE GROWTH FACTOR

Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus

Summary

The activity of ATP- and Ca^{2+} -dependent proteases was studied in pheochromocytoma PC12 cells after their cultivation with plasminogen (SK) and nerve growth factor (NGF) in different concentrations or with combination of SK + NGF. It was found that a short-term exposure of pheochromocytoma PC12 cells to SK and NGF induced noticeable changes of proteolysis. These changes have complex character, in the dependence on SK and NGF concentrations and combinations. In fact, presented data firstly illustrate the metabolic effect of SK in cells. The mechanism is still unclear, and this phenomenon nature is complex task for study in perspective.