

**ВЛИЯНИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ
ЛОШАДИ НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ
КЛЕТОК НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

В.С. Лукашевич, Е.Ф. Полукошко, А.А. Романовская, Р.И. Гронская, В.Н. Никандров

Институт физиологии Н АНБеларуси, Минск, Республика Беларусь

Введение.

Супероксиддисмутаза (СОД, $O_2^{\cdot-}$ - $O_2^{\cdot-}$ оксидоредуктаза, КФ 1.15.1.1.), катализирующая реакцию дисмутации супероксидного радикала в перекись водорода, играет важную роль в защитной системе клетки против разрушительного действия активных форм кислорода и совместно с каталазой и глутатионпероксидазой регулирует свободнорадикальные процессы клеточного метаболизма [1]. Научный и практический интерес к СОД привел к развитию технологий по получению фермента из животного и растительного сырья и микроорганизмов, в том числе и генно-инженерным путем, стимулировал расширение исследований, касающихся изучения свойств СОД из различных источников, выявления новых сфер медицинского применения, создания иммобилизованных форм СОД, стабильных в кровотоке. Результатом этих усилий стало производство за рубежом ряда медицинских препаратов на основе СОД, например, препарата «Пероксинорм» ("Grumenthal", Германия), применяемого в качестве противовоспалительного средства для лечения артритов различной этиологии; российского препарата - «Эрисод», оказывающего терапевтический эффект при кератоконъюнктивитах герпетической этиологии.

В литературе имеется достаточно сведений о цитопротекторной роли СОД, заключающейся в трансформации супероксид-радикала в менее реакционноспособную перекись водорода [2,3], однако непосредственное влияние фермента на морфо-функциональное состояние клеток нервной системы изучено недостаточно. Более того, при проведении предклинических испытаний новых лекарственных форм не предусмотрено проведение исследований на культурах компетентных клеток, хотя это могло бы дать важные сведения, как об эффективности, так и о безопасности применяемых препаратов.

Целью настоящей работы явилось изучение действия СОД на морфо-функциональное состояние первичных (диссоциированная культура краниального шейного ганглия /КШГ/ новорожденной крысы) и перевиваемых (глиома С6, нейробластома IMR-32) культур клеток нервной системы.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Определить, как влияет добавка СОД в среду культивирования на развитие и рост культуры КШГ;
2. Установить, как изменяется содержание нуклеиновых кислот и белка в клетках глиомы С6.
3. Выяснить влияние СОД на жизнеспособность клеток.

Методы исследования. Для получения культуры диссоциированных нейронов из новорожденных белых крыс (время жизни – 1сутки) использовали стандартную схему диссоциации [4], включающую в себя 2-х кратную промывку извлеченных симпатических ганглиев в буферном растворе, лишенном ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , и последующую их инкубацию в 0,25% растворе трипсина при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Время обработки ферментом составляло 10-15 минут. Затем трипсин инактивировали буферным раствором, содержащим не менее 20% сыворотки. Обработанные таким образом ганглии механически тонкими иглами и при помощи пипеток диссоциировали на отдельные и/или группы нейронов. Начальная концентрация культивируемых нейронов составляла 100-500 клеток на стекло размером 18 на 18 мм, которые культивировались в пластиковых чашках Петри. Для культивирования диссоциированных симпатических нейронов в состав ростовой среды обязательно вводили фактор роста нервов (ФРН) в дозе 100 мкг/мл.

В работе также были использованы культуры клеток крысиной глиомы С6 и клетки нейробластомы человека IMR-32 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных животных, Санкт-Петербург). Все клеточные культуры выращивали в среде DMEM (Sigma, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Бельгия) заранее инактивированной 30 мин прогреванием при 56°C , 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при температуре 37°C в CO_2 -инкубаторе (Heraeus, Германия). Питательные среды меняли через 3-4 дня. При пересеве клеток использовали 0,25% трипсин (Sigma, США) и 0,02% версен (Диалек, Беларусь).

Для проведения эксперимента монослойную культуру клеток рассеивали на пластиковые чашки (диаметр 35 мм) с плотностью 25 000 клеток/см². На следующие сутки клетки переводили на среду DMEM с 0,5%-содержанием телячьей сыворотки с целью синхронизировать популяцию клеток глиомы и нейробластомы в клеточном цикле и исключить влияние ростовых факторов и питательных веществ, содержащихся в сыворотке. В последующие сутки в культуру глиомы С6 вносили DMEM с добавлением 0,5 % телячьей сыворотки и СОД в концентрациях 10^{-7}M и 10^{-9}M . Контролем служили клетки, инкубировавшиеся в среде, содержащей 0,5% ТС. В чашки с нейробластомой

IMR-32 вносили СОД, ФРН или же смесь этих двух белков. В контрольные образцы, содержащие 0,5% сыворотки, указанные белки не добавляли. Время наблюдения за культурами перевиваемых линий составило одни (когда только начинают разворачиваться морфо-функциональные изменения клеток) и трое суток (когда эти изменения уже достаточно выражены). Содержание СОД в составе экспериментальных ростовых сред для диссоциированной культуры составляло 10^{-7} и 10^{-8} М. Добавление изучаемых реагентов в ростовую питательную среду производилось однократно спустя сутки от начала культивирования. Время наблюдения – до 7 суток.

Хроматографически гомогенные СОД из эритроцитов лошади (уд. активность 700 ед/мг) и ФРН из подчелюстных слюнных желез самцов мышей (100нг – 1 БЕ) получали методами препаративной биохимии и стерилизовали перед внесением в питательную среду путем пропускания через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США).

Определение содержания ДНК, РНК и белка в клетках проводили с использованием метода двухволновой спектрофотометрии, как описывалось ранее [5]. Кратко, к осадку клеток добавляли по 1 мл 0,3 М хлорной кислоты и оставляли на 15 минут при 0° С. После этого пробы отмывали 3 раза (1000 г, 5 мин). К осадку клеток прибавляли по 0,5 мл дистиллированной воды и 0,5 мл 0,6 М раствора КОН при 20° С. Пробы инкубировали 1 час при 37° . К осадку клеток прибавляли 2 мл 0,6 М раствора хлорной кислоты (0° С) и оставляли на 15 минут на льду, далее центрифугировали пробы при 2 000 - 3 000 г 10 минут. Супернатант оставляли для измерения количества РНК и белка в пробах. Стенки пробирки тщательно высушивали, к осадку добавляли 2 мл 0,5 М раствора хлорной кислоты и производили гидролиз в течение 20 минут при 80° С. В гидролизате производили определение содержания ДНК и белка. Оптическую плотность супернатанта и гидролизата для определения концентраций ДНК, РНК, белка измеряли при 270 и 290 нм (спектрофотометр Cary-100, Varian, США). Каждый опыт проводили в триплетах не менее трех раз. Количество клеток учитывалось в камере Горяева. Морфологические изменения учитывались в фазово-контрастном микроскопе (OPTON®, Германия).

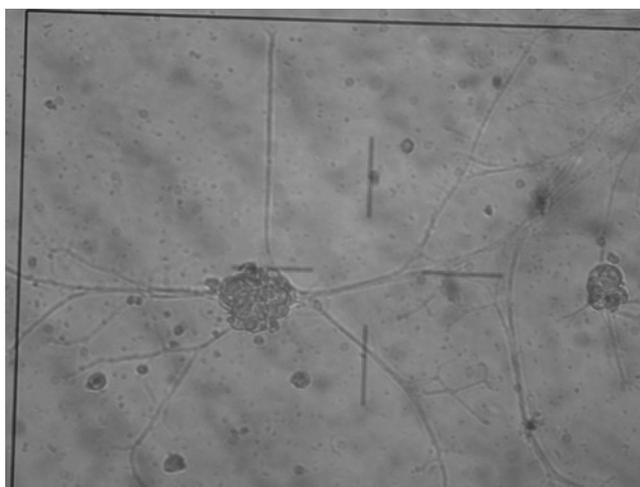
Для количественной характеристики прижизненной окраски клеток применяли нейтральный красный. Метод основан на регистрации изменений сорбционного уровня протоплазмы. Контрольные и опытные препараты окрашивали 0,005% раствором нейтрального красного, затем его извлекали и клетки заливали 70⁰-ным этиловым спиртом, подкисленным 2%-ной серной кислотой. Спиртовые вытяжки фотометрировали при длине волны 540 нм [6]. Статистическую обработку результатов проводили в

программе Statistica 6.0. Результаты представляли как среднее \pm стандартное отклонение. Сравнение выборок производили при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни.

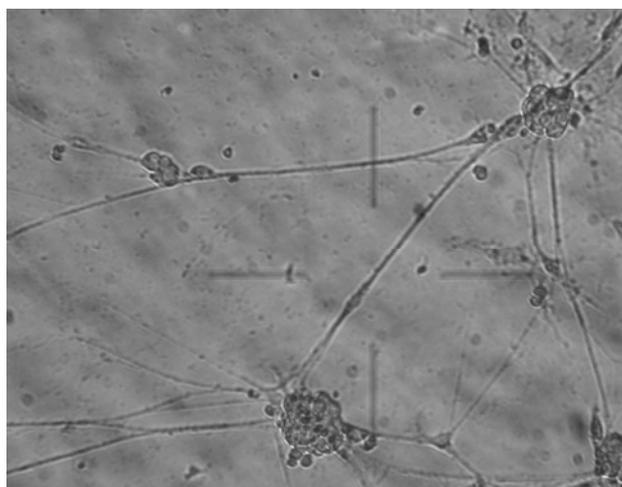
Результаты и обсуждение.

Влияние СОД на развитие клеток в диссоциированной культуре КШГ новорожденных крыс

При культивировании диссоциированных симпатических нейронов КШГ новорожденных крыс в среде, которая содержала СОД (10^{-7} и 10^{-8} М), уже спустя 1 сутки наблюдалось увеличение адгезии клеток к субстрату, что приводило к их большей выживаемости по отношению к контрольным культурам. Ускоренное развитие нейронов: вырост



контроль



СОД (10^{-8} М)

Рисунок 1 – Влияние СОД на диссоциированную культуру КШГ (седьмые сутки инкубации). Проходящий свет, увеличение 7x16.

отростков, изменение их длины, увеличение размера сомы нервных клеток отмечалось в культурах, питательная среда которых содержала СОД. Через 7 суток (рис. 1) 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. Наиболее благоприятным явилось развитие диссоциированных нейронов КШГ в питательной среде, в состав которой входил ФРН и СОД (10^{-8} М).

Таким образом, проведенные исследования выявили стимулирующую роль супероксиддисмутазы на рост и развитие диссоциированных нейронов КШГ.

Влияния СОД на выживаемость, биосинтез макромолекул в культуре клеток глиомы С6

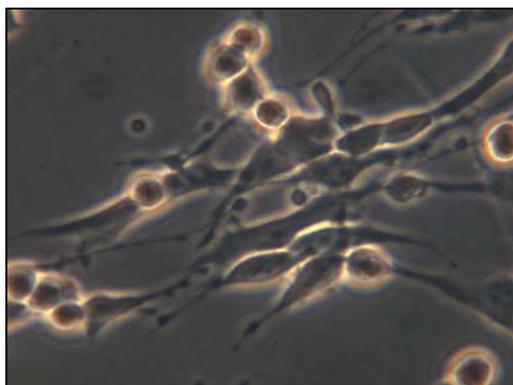
В первые 24 часа инкубации клеток глиомы С6 с различными концентрациями СОД не было выявлено каких-либо статистически значимых отличий по сравнению с контрольными показателями.

Таблица 1. Влияние СОД на уровень макромолекул в клетках глиомы С6 и количество клеток (время экспозиции - 1 и 3 суток)

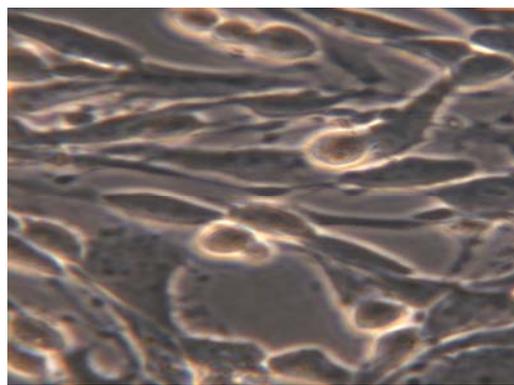
| Концентрация СОД | Белок, мкг/мл | РНК, мкг/мл | ДНК, мкг/мл | Количество клеток на мл среды |
|-------------------------|---------------|-------------|-------------|-------------------------------|
| 1 сутки культивирования | | | | |
| Контроль (0) | 112,34±7,89 | 7,04±0,53 | 5,29±0,71 | 300 000±40 000 |
| 10 ⁻⁷ М | 110,15±14,11 | 7,5±0,46 | 4,16±1,17 | 255 000±30 000 |
| 10 ⁻⁹ М | 104,27±4,46 | 6,83±0,54 | 4,29±0,61 | 260 000±15 000 |
| 3 суток культивирования | | | | |
| Контроль (0) | 112,97±7,28 | 8,28±1,11 | 5,44±0,19 | 650 000±75 000 |
| 10 ⁻⁷ М | 147,59±10,57* | 11,81±1,63* | 6,31±0,83* | 1 300 000±400 000* |
| 10 ⁻⁹ М | 128,84±9,26* | 9,15±1,02 | 5,65±0,28 | 975 000±250 000* |

* - различия достоверны по сравнению с контролем при p<0,05

В течение последующего времени инкубирования наблюдалась стимуляция пролиферативной активности у клеток в присутствии СОД. При концентрации СОД в инкубационной среде 10⁻⁷М на третьи сутки культивирования было отмечено достоверное увеличение содержания нуклеиновых кислот и белка в клетках, а также наблюдалось увеличение количества клеток в 2 раза по сравнению с контролем. На более низкой концентрации СОД (10⁻⁹М) наблюдалось четкое увеличение концентрации общего белка и количества клеток, но что касается нуклеиновых кислот, то их содержание выросло недостоверно по отношению к контролю. Так что в этом случае можно говорить лишь о тенденции к увеличению ДНК и РНК.



Контроль



СОД в концентрации $10^{-7}M$

Рисунок 2 – Влияние СОД на морфологические характеристики клеток глиомы С6 (третьи сутки инкубации). Фазовый контраст (увеличение $\times 40$).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют наличие положительного эффекта у СОД в отношении клеточной пролиферации. Причем эффект этот снижается с уменьшением концентрации фермента в среде культивирования.

Влияния СОД на выживаемость, пролиферацию и дифференциацию в культуре клеток человеческой нейробластомы IMR-32

При действии СОД в концентрации $10^{-7}M$ сорбция нейтрального красного клетками нейробластомы достоверно снижалась на 9%. В течение времени наблюдения (3 суток) цитотоксический эффект СОД усиливался. Он снимался в присутствии ФРН. Лишь при воздействии на клетки СОД в концентрации $10^{-9}M$ в присутствии ФРН отмечено увеличение сорбции красителя на 18%.

А

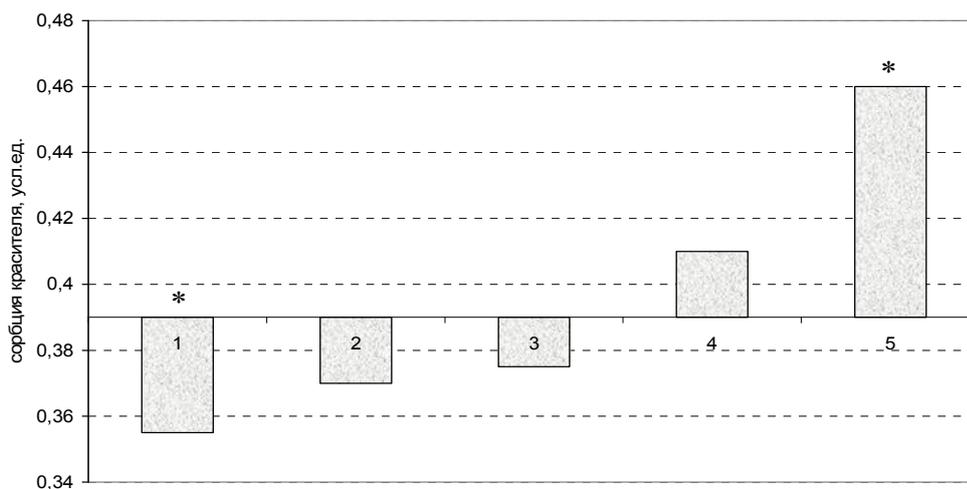


Рисунок 3 – Индивидуальное и совместное влияние СОД и ФРН на клетки нейробластомы человека IMR-32 (1 сутки). Примечание: сплошная линия контроль (0,5 % сыворотки). Концентрации СОД: 1– $10^{-7}M$, 2– $10^{-9}M$. 3–ФРН (100нг/мл), 4–ФРН+СОД ($10^{-7}M$), 5–ФРН+СОД ($10^{-9}M$). * – различие достоверно по отношению к контролю при $P < 0,05$.

Выводы.

1. Таким образом, впервые выявлено стимулирующее влияние СОД на рост и развитие культур диссоциированных нейронов КШГ новорожденных крыс, дозозависимое усиление пролиферации клеток глиомы С6, выражающееся в увеличении биосинтеза макромолекул и количества клеток. СОД оказывал негативное влияние на злокачественную нейробластому IMR-32. Концентрация СОД 10^{-7} М оказывала токсический эффект. На 3 сутки культивирования наблюдалась гибель клеток. Негативное воздействие СОД на клетки данной линии нейробластомы носило дозозависимый характер.

2. Вышеприведенные методические подходы и пакет клеточных культур (первичные, доброкачественные и малигнизированные) могут быть использованы для оценки эффективности и безопасности лекарственных форм нейротропного назначения.

Работа поддержана грантом БФФИ №БО4-302.

Литература

1. Gutteridge, J. M. C. Free radicals in disease processes: a comparison of cause and consequence / J.M.C. Gutteridge // *Free Radic. Res. Commun.* – 1993. – V. 19. – P. 141-158.
2. Меньщикова, Е.Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков // *Успехи совр. биологии* – 1993. – V. 113 – P. 442-455.
3. Petkau, A. Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutase / A. Petkau // *Cancer Treat. Rev.* – 1986. – V.13. – P. 17-44.
4. Hawrot, E. Long-term culture of dissociated sympathetic neurons / E. Hawrot, P.H. Patterson // *Methods in enzymology. Cell culture* / ed. W.B. Jacoby. – New York, 1979. – Vol. LVIII. – P. 574-584.
5. Романовская, А.А. Действие различных доз пируваткиназы на рост клеток глиомы С6 / А.А. Романовская // *Изв. НАН Бел. Сер. мед. наук.* – 2005. – № 5. – С. 38-41.
6. Borenfreund, E. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption / E. Borenfreund, J.A. Puerner // *Toxicol. Lett.* – 1985. – Vol. 24. – P. 119-124.