

РЕГУЛЯЦИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ АСТРОГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА

© Т. А. Кулагова,¹ Г. Н. Семенкова,¹ З. Б. Квачева,² С. Н. Черенкевич¹

¹ Кафедра биофизики физического факультета Белорусского государственного университета
и ² Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ, Минск, Беларусь;

¹ электронный адрес: tatyana_kulagova@tut.by

Изучено влияние пероксида водорода на морфологические характеристики, индекс пролиферации и менадионзависимую люцигенинопосредованную хемилюминесценцию перевиваемых клеток глиомы крысы С6. Установлено, что H_2O_2 в диапазоне концентраций $5 \cdot 10^{-7}$ — $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л выступает в качестве регулятора морфологических и функциональных свойств астроцитов, индуцируя реактивацию, которая проявляется в гипертрофии клеточных тел, увеличении пролиферативной активности и продукции супероксидных анион-радикалов ($O_2^{\bullet-}$), индуцируемых менадином. Цитодеструктивное действие пероксида водорода в концентрациях выше $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л в отношении культуры клеток С6 выражается в снижении их индекса пролиферации и способности генерировать $O_2^{\bullet-}$ при действии менадиона. Использование липополисахарида в качестве функционального стимулятора показало, что H_2O_2 модифицирует сигнальные пути, приводящие к усилению митотической активности клеток С6, и вызывает снижение выхода люцигенинзависимой ХЛ астроцитов при действии менадиона до уровня контрольных значений.

Ключевые слова: перевиваемые клетки глиомы крысы С6, пероксид водорода, липополисахарид, пролиферативная активность, хемилюминесценция.

Принятые сокращения: ИП — индекс пролиферации, ЛПС — липополисахарид В, ХЛ — хемилюминесценция, ΣI — интегральная интенсивность ХЛ.

Пероксид водорода в зависимости от концентрации обладает двойственным влиянием на функциональное состояние различных типов клеток. H_2O_2 в миллимолярных концентрациях в клетках *in vitro* индуцирует разрывы цепей ДНК, перекисное окисление липидов, снижение интенсивности гликолиза и морфологические изменения плазматических мембран, вызывая гибель клеток по механизмам апоптоза или некроза (Finkel, Holbrook, 2000; Martindale, Holbrook, 2002). Пероксид водорода в низких концентрациях является вторичным мессенджером, участвует в процессах трансдукции сигнала, инициирует фосфорилирование белков (Suzuki, 1997), активизирует факторы транскрипции, в частности NF- κ B (Schreck, Baeuerle, 1991), MAP-киназы (Guyton et al., 1996; Crossthwaite et al., 2002) протеинкиназы (Dröge, 2002) и т. д., влияя таким образом на функциональные свойства клеток (Гамалей, Клубин, 1996).

Одним из источников H_2O_2 в центральной нервной системе являются микроглиальные клетки, активированные цитокинами и β -амилоидным пептидом, и нейроны при возникновении недостатка L-аргинина или тетрагидробиоптерина (Torreilles, 1999). Высокая проницаемость мембран для H_2O_2 и относительно продолжительное время жизни приводят к тому, что пероксид водорода действует не только на клетки-продуценты, но и на соседние, в частности на астроциты. Известно, что астроциты в мозге выполняют ряд важных функций: регулируют внеклеточную концентрацию ионов, метаболитов и нейротрансмиттеров, поддерживают нейрональные и

синаптические функции, образуют вместе с церебральными эндотелиальными клетками гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) (Ройтбак, 1993; Hansson, Ronnbäck, 2003), принимают участие в инициации и регуляции иммунного и воспалительного ответов при повреждении и патологических состояниях мозга (Dong, Benveniste, 2001). Поэтому изучение влияния H_2O_2 на свойства астроцитов является актуальным.

Ранее нами хемилюминесцентным методом показано, что при стимуляции метаболизма клеток С6 частицами латекса, арахидоновой кислотой, липополисахаридом (ЛПС) и фитогемагглютинином образования активных форм кислорода не наблюдается (Кулагова и др., 2005). Однако при добавлении менадиона астроциты генерируют супероксидные анион-радикалы (Kulahava et al., 2003), причем изменение интенсивности менадионзависимой люцигенинопосредованной ХЛ отражает функциональное состояние этих клеток. Так, мы обнаружили, что способность клеток С6 продуцировать $O_2^{\bullet-}$ положительно коррелирует с изменением их митотической активности (Kulahava et al., 2003; Семенкова и др., 2005). Это послужило основанием для использования параметров менадионзависимой ХЛ клеток С6 в присутствии люцигенина для оценки их функциональной активности клеток.

В настоящей работе исследовано влияние H_2O_2 на пролиферативную активность, менадионзависимую продукцию $O_2^{\bullet-}$, морфологические характеристики и жизнеспособность перевиваемых клеток глиомы крысы С6.

Материал и методика

Перевиваемая линия клеток глиомы крысы С6 получена из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

В работе использовали среду Игла MEM с добавлением NEPES (Sigma, США), сбалансированный солевой раствор Эрла (0.12 моль/л NaCl, $5.4 \cdot 10^{-3}$ моль/л KCl, $0.9 \cdot 10^{-3}$ моль/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.8 \cdot 10^{-3}$ моль/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $5.6 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы, $1.8 \cdot 10^{-3}$ моль/л CaCl_2 и $26.2 \cdot 10^{-3}$ моль/л NaHCO_3 производства «Анализ X», Республика Беларусь), сыворотку плодов коров (ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ Республики Беларусь), гентамицин (ОАО «Белмедпрепараты», Республика Беларусь), люцигенин (10,10-диметил-биакридиний) (Fluka, Швейцария), H_2O_2 и Тритон X-100 («Диалек», Республика Беларусь), а также ЛПС, гематоксилин, эозин, менадион (2-метил-1,4-нафтохинон), диметилсульфоксид и пропидиум иодид (Sigma, США).

Перевиваемые клетки глиомы крысы С6 культивировали в плоских флаконах и на помещенных во флаконы покровных стеклах в среде Игла MEM с NEPES с добавлением 10 % сыворотки плодов коров и $1 \cdot 10^{-4}$ г/мл гентамицина при 37 °С. Посевная доза клеток составляла $1.5 \cdot 10^5$ клеток/мл (Квачева и др., 1980). Через 48 ч культивирования (в логарифмической фазе роста) проводили смену ростовой среды на поддерживающую (среда Игла без сыворотки). Затем во флаконы вносили раствор H_2O_2 в диапазоне конечных концентраций $1 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-9}$ моль/л и ЛПС в конечной концентрации $0.1 \cdot 10^{-6}$ г/мл на 24 ч. Объем добавляемых растворов не превышал 10 % от общего объема пробы. Полученные препараты клеток фиксировали в жидкости Дюбоск—Бразиль—Буэна, окрашивали гематоксилином и эозином, после чего анализировали под световым микроскопом, используя об. 40× и ок. 10×.

Влияние H_2O_2 на морфологические характеристики клеток и на пролиферативную активность исследовали методом световой микроскопии. Пролиферативную активность определяли по накоплению клеток в сформированном монослое в стационарной фазе роста и выражали с помощью индекса пролиферации как отношение количества клеток во флаконе к количеству посеянных клеток.

Жизнеспособность клеток определяли флуоресцентным методом на спектрофлуориметре (LSF 1211A «Солар», Республика Беларусь) с использованием пропидиум иодида (Kato et al., 1999), молекулы которого проникают в клетку только при повреждении цитоплазматических мембран и встраиваются между нуклеотидами ДНК и РНК. После культивирования образцов С6 с H_2O_2 в течение 24 ч монослой клеток дважды промывали сбалансированным солевым раствором Эрла, после чего вносили раствор пропидиум иодида в концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ моль/л, перемешивали и через 5 мин измеряли интенсивность флуоресценции F_{d1} ($\lambda_{\text{возб.}} = 530$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 645$ нм). Затем клетки разрушали с помощью Тритона X-100 и регистрировали интенсивность флуоресценции F_{t1} . Жизнеспособность клеток определяли по формуле

$$\frac{(F_{t1} - F_{t2}) - (F_{d1} - F_{d2})}{(F_{t1} - F_{t2})} \cdot 100\%,$$

где F_{d2} и F_{t2} — интенсивность флуоресценции пропидиума иодида и Тритона X-100 соответственно в сбалансированном солевом растворе Эрла.

Менадионзависимое образование $\text{O}_2^{\cdot -}$ в суспензии клеток С6 регистрировали хемилюминесцентным методом на биохемилюминетре «БХЛ-1» при 37 °С и рН 7.4 с использованием $1.25 \cdot 10^{-5}$ моль/л люцигенина в качестве специфического эмиттера ХЛ $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Li et al., 1998). Клетки С6 культивировали с H_2O_2 в течение 24 ч, как описано выше. Перед измерением ХЛ прикрепленные к поверхности флакона клетки снимали механическим способом с помощью скребка. Полученную суспензию отмывали сбалансированным солевым раствором Эрла и доводили до концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Менадион использовали в концентрации $1.6 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

При математической обработке результатов определяли среднюю величину для группы измерений (более трех). Полученные данные представлены как средние значения и их стандартные отклонения.

Результаты

При культивировании перевиваемых клеток глиомы крысы С6 в течение 24 ч с H_2O_2 в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-9}$ моль/л обнаружены изменения морфологических характеристик, степень проявления которых зависит от дозы препарата. H_2O_2 в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л вызывал разрушение монослоя клеток (10—100 %). На рис. 1, б показано уменьшение плотности монослоя клеток С6 по сравнению с интактной культурой (рис. 1, а) при действии H_2O_2 в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. При культивировании астроцитов с H_2O_2 в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ — $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л монослой не нарушался и клетки сохраняли свою жизнеспособность. При этом у части из них наблюдали гипертрофию клеточных тел (рис. 1, в). Воздействие H_2O_2 в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ — $1 \cdot 10^{-9}$ моль/л не оказывало влияния на морфологические характеристики клеток С6.

Для количественной оценки влияния H_2O_2 на морфологические характеристики клеток С6 в культуре (при культивировании в течение 24 ч) определяли жизнеспособность клеток с использованием пропидиум иодида. На рис. 2 видно, что с уменьшением концентрации H_2O_2 от $1 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л количество жизнеспособных клеток увеличивается до уровня, зарегистрированного в контрольных образцах.

В литературе показано, что активные формы кислорода в микромолярных концентрациях могут стимулировать пролиферативную активность клеток (Łuczak et al., 2004). Нами определен индекс пролиферации (ИП) перевиваемых клеток глиомы крысы С6 после воздействия H_2O_2 в течение 24 ч. На рис. 3 видно, что увеличение концентрации H_2O_2 в среде культивирования от $5 \cdot 10^{-8}$ до $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л приводит к значительному (до 1.6 раза) повышению пролиферативной активности клеток. При дальнейшем увеличении концентрации H_2O_2 ИП снижается и достигает уровня контрольных значений уже при концентрации H_2O_2 , равной $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

На рис. 4 приведена зависимость интегральной интенсивности люцигенинопосредованной ХЛ от концентрации H_2O_2 при добавлении менадиона в суспензию клеток С6. Видно, что культивирование клеток с H_2O_2 в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ — $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л в течение 24 ч приводит к увеличению интенсивности ХЛ. Максимальные значения интегральной интенсивности ХЛ были зарегистрированы при концентрации H_2O_2 , равной $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Дальнейшее повышение концентрации

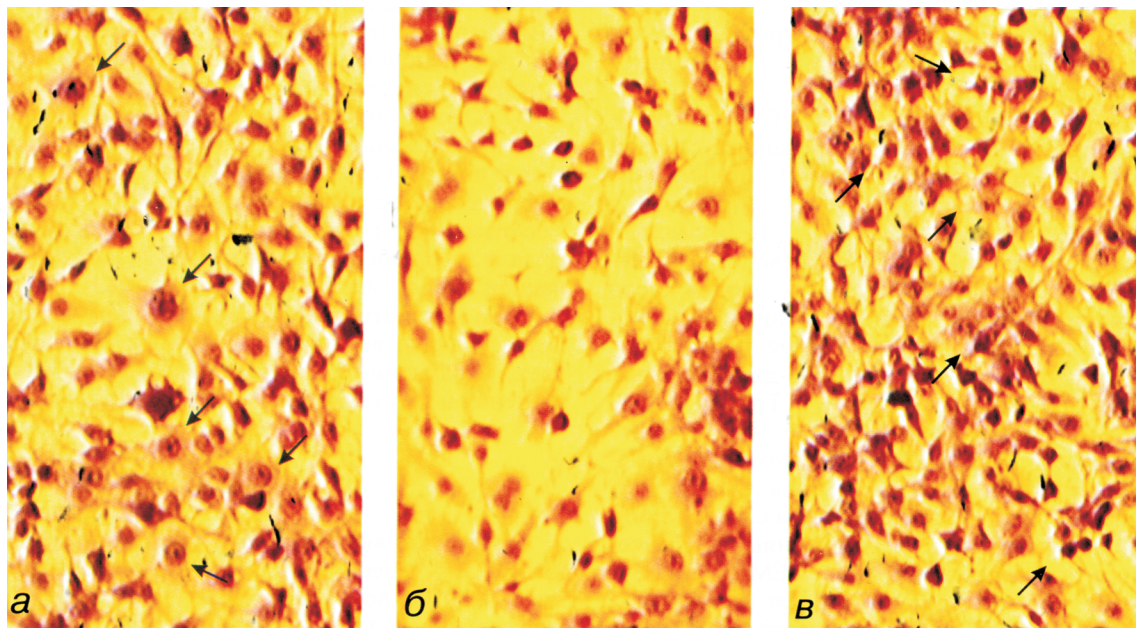


Рис. 1. Морфологические изменения перевиваемых клеток глиомы крысы С6 при действии пероксида водорода в течение 24 ч. *а* — сформированный монослой клеток С6; *б* — цитотоксическое действие H_2O_2 в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; *в* — реактивация астроцитов при культивировании с $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л H_2O_2 (стрелками указаны реактивированные клетки). Окраска эозином и гематоксилином. Об. $40\times$, ок. $10\times$.

H_2O_2 сопровождалось снижением выхода $O_2^{\cdot -}$ до уровня контрольных значений, а при увеличении концентрации H_2O_2 до $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л выход $O_2^{\cdot -}$ снижался по сравнению с контролем в 2 раза.

ЛПС является эффективным стимулятором иммунокомпетентных клеток, в том числе и астроцитов (Garling, Tobias, 1997). Как показано на рис. 3, при культивировании клеток глиомы крысы С6 с ЛПС в концентрации $0.1 \cdot 10^{-6}$ г/мл в течение 24 ч пролиферативная активность повышается в 1.5 раза по сравнению с контролем. Видно, что при сочетанном действии ЛПС и H_2O_2 в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л ИП уменьшается в 2 раза и до-

стигает значения, зарегистрированного при добавлении H_2O_2 в отсутствие ЛПС. В то же время понижение концентрации H_2O_2 до $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л на фоне воздействия ЛПС приводит к восстановлению ИП до уровня, отмеченного в контрольных пробах с ЛПС.

Функциональные изменения в клетках С6 при сочетанном действии H_2O_2 и ЛПС согласуются с результатами, полученными при изучении менадионзависимой ХЛ. На рис. 5 представлены результаты измерения интегральной интенсивности (ΣI) люцигенинопосредованной ХЛ суспензии клеток С6, полученные после их совместного инкубирования с $0.1 \cdot 10^{-6}$ г/мл ЛПС и H_2O_2 в раз-

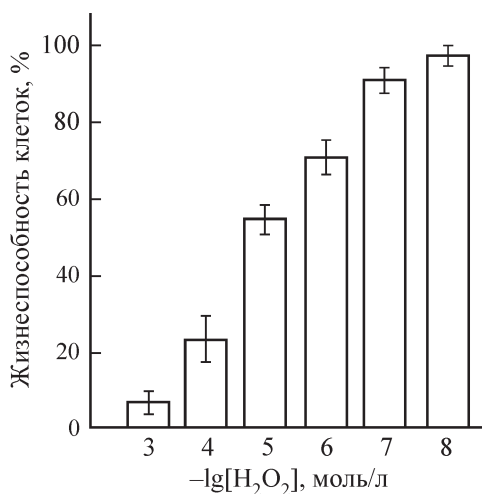


Рис. 2. Жизнеспособность перевиваемых клеток глиомы крысы С6 после воздействия H_2O_2 в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л в течение 24 ч.

За 100 % принята жизнеспособность клеток, культивируемых в среде, не содержащей H_2O_2 , в течение 24 ч.

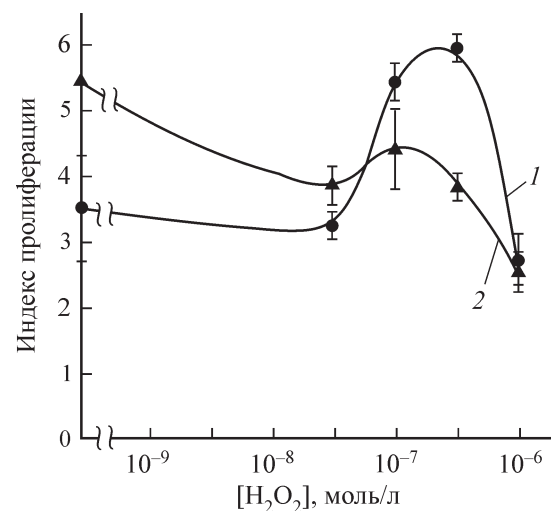


Рис. 3. Влияние H_2O_2 на индекс пролиферации перевиваемых клеток глиомы крысы С6 в отсутствие (1) и в присутствии (2) $0.1 \cdot 10^{-6}$ г/мл ЛПС.

Продолжительность культивирования с ЛПС и (или) H_2O_2 24 ч.

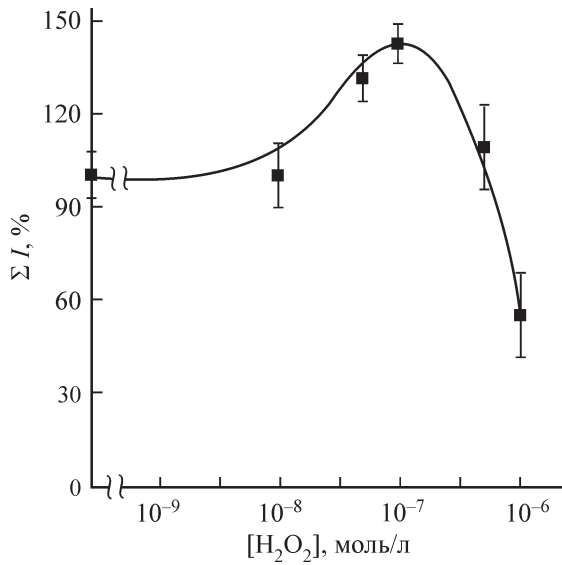


Рис. 4. Зависимость интегральной интенсивности люцигенино-посредованной ХЛ (ΣI) при действии менадиона на суспензию перевиваемых клеток глиомы крысы С6 от концентрации H_2O_2 . Концентрация менадиона $1.6 \cdot 10^{-5}$, люцигенина — $1.25 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Время культивирования с H_2O_2 24 ч.

личных концентрациях в течение 24 ч. Сочетанное действие ЛПС и H_2O_2 в концентрации 10^{-7} — 10^{-8} моль/л вызывает снижение выхода люцигенинзависимой ХЛ астроцитов при действии менадиона до контрольного уровня, что свидетельствует о снижении активности менадионзависимых $O_2^{\cdot-}$ -генерирующих систем астроцитов.

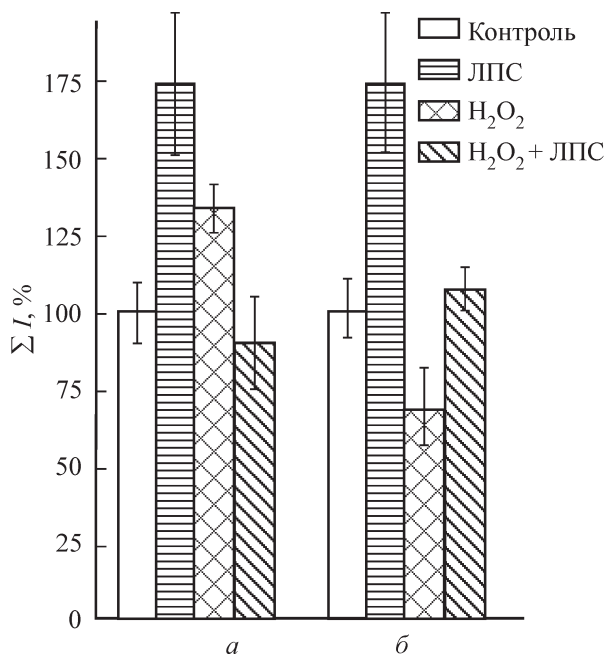


Рис. 5. Интегральная интенсивность люцигенино-посредованной ХЛ (ΣI) при действии менадиона на суспензию перевиваемых клеток глиомы крысы С6 после культивирования их с ЛПС или H_2O_2 порознь и совместно в течение 24 ч.

Концентрация H_2O_2 — $1 \cdot 10^{-7}$ (а) или $1 \cdot 10^{-8}$ (б) моль/л. Концентрация менадиона $1.6 \cdot 10^{-5}$, люцигенина — $1.25 \cdot 10^{-5}$ моль/л, ЛПС — $0.1 \cdot 10^{-6}$ г/мл.

Обсуждение

Известно, что при патологических изменениях (травмах, нейродегенеративных заболеваниях) и посттравматической регенерации мозга происходят миграция астроцитов в область повреждения и реактивация этих клеток (Ridet et al., 1997; Raivich et al., 1999). При этом наблюдаются гипертрофия клеток и ядер (астроглиоз), пролиферация (астроцитоз), удлинение и ветвление отростков, усиление синтеза протеинов (глиального фибриллярного кислого белка, виментина и нестина) — структурных единиц цитоскелета астроцитов. Реактивация также характеризуется усилением метаболической активности астроцитов, которая заключается в продукции различных трофических и ростовых факторов, цитокинов, монооксида азота, экспрессии цитозольных антиоксидантных белков (глутатион-S-трансферазы-1, церуллоплазмينا и др.) и т. д. (Norton et al., 1992; Liberto et al., 2004).

Судя по результатам настоящего исследования, пероксид водорода в концентрациях от $5 \cdot 10^{-7}$ до $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л приводит к реактивации перевиваемых клеток глиомы крысы С6. Так, в нашей системе при действии H_2O_2 в этих концентрациях отмечены гипертрофия клеточных тел, рост индекса пролиферации, а также увеличение интегральной интенсивности менадионзависимой люцигенино-посредованной ХЛ клеток С6. Основываясь на ранее полученных данных (Семенкова и др., 2005), можно заключить, что H_2O_2 в данном диапазоне концентраций стимулирует функциональную активность клеток С6. Однако при увеличении концентрации H_2O_2 до $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л наблюдаются разрушение и разреженность клеточного монослоя, незначительное снижение ИП и ΣI менадионзависимой люцигенино-посредованной ХЛ клеток С6, что свидетельствует о цитодеструктивном действии препарата.

Из данных литературы следует, что между астроцитами и другими клетками мозга — как нейрональными, так и глиальными — идет непрерывный обмен веществом и информацией (Hansson, Ronnbäck, 2003). Причем один астроцит может контактировать со множеством клеток разных типов одновременно, выполняя функцию посредника в передаче сигнала в мозге, а также участвуя в процессах нейрогенеза, синаптогенеза, васкулогенеза, ангиогенеза, ремиелинизации и т. д. (Liberto et al., 2004). Следовательно, цитодеструктивное действие H_2O_2 будет приводить к снижению числа межклеточных взаимодействий.

В литературе показано, что H_2O_2 , являясь вторичным мессенджером, взаимодействует с некоторыми участниками цепей передачи сигнала в клетках различных типов, включая астроциты, модулируя активацию транскрипционных факторов и экспрессию генов (Pawate et al., 2004). Для определения того, какую роль играет H_2O_2 в функционировании стимулированных астроцитов, мы исследовали влияние этого интермедиата на функциональное состояние ЛПС-стимулированных клеток С6. Известно, что при действии этого эндотоксина активируются внутриклеточные рецепторопосредованные сигнальные каскады и клетки продуцируют различные цитокины, адгезионные белки и оксид азота (II) (Tasaki et al., 1997; Chen et al., 1998).

Результаты, полученные при оценке ИП после сочетанного действия H_2O_2 и ЛПС, свидетельствуют в пользу модифицирующего влияния H_2O_2 на сигнальные пути, приводящего к усилению митотической активности аст-

роцитов. Это согласуется с данными, полученными при изучении пролиферативной активности лимфоцитов (Lee, Yea, 2000). Авторами показано, что H_2O_2 оказывает дозозависимое ингибирование пролиферации В- и Т-лимфоцитов, стимулированной ЛПС и конканавалином А соответственно, причем эти эффекты связывают с ингибирующим действием H_2O_2 на протеинкиназу С, которая активируется ЛПС.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что H_2O_2 в диапазоне концентраций $5 \cdot 10^{-7}$ — $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л выступает в качестве регулятора морфологических и функциональных свойств клеток перевиваемой глиомы крысы С6, индуцируя реактивацию астроцитов, которая проявляется в гипертрофии клеточных тел, увеличении пролиферативной активности и продукции $O_2^{\bullet -}$, индуцируемой менадионом. Цитодеструктивное действие H_2O_2 в концентрации выше $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л в отношении культуры клеток С6 выражается в снижении их ИП и способности генерировать $O_2^{\bullet -}$ при действии менадиона.

Результаты влияния H_2O_2 на пролиферативную активность и люцигенинзависимую ХЛ астроцитов, стимулированных и не стимулированных ЛПС, дают основания предположить, что пути передачи сигнала при действии H_2O_2 в микромолярных концентрациях и ЛПС зависят от «перекрестных» МАР-киназ, входящих в сигнальные каскады, что приводит к изменению функционального отклика астроцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б00-270).

Список литературы

- Гамалей И. А., Клюбин И. В. 1996. Перекись водорода как сигнальная молекула. Цитология. 38 (12) : 1233—1242.
- Квачева З. Б., Рытик П. Г., Хмара М. Е., Семенко Н. Б. 1980. Характеристика первичного роста монослойных культур клеток мозга взрослого человека на различных питательных средах. Здравоохранение Белоруссии. 11 : 50—52.
- Кулагова Т. А., Семенкова Г. Н., Квачева З. Б. 2005. Поиск систем генерации активных форм кислорода в астроцитах. В кн.: Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы. Минск: БГУ. 182—185.
- Ройтбак А. И. 1993. Глия и ее роль в нервной деятельности. М.: Наука. 380 с.
- Семенкова Г. Н., Кулагова Т. А., Квачева З. Б., Черенкевич С. Н. 2005. Менадион-индуцированное образование супероксида и митотическая активность клеток нейроглии. Нейроиммунология. 3 (1) : 23—27.
- Chen C.-C., Wang J.-K., Chen W.-C., Lin S.-B. 1998. Protein kinase C mediates lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in primary astrocytes. J. Biol. Chem. 273 : 19 424—19 430.
- Crossthwaite A. J., Hasan S., Williams R. J. 2002. Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurons: dependence on Ca^{2+} and PI3-kinase. J. Neurochem. 80 : 24—35.
- Dong Y., Benveniste E. N. 2001. Immune function of astrocytes. Clin. 36 : 180—190.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 82 : 47—95.
- Finkel T., Holbrook N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. Nature. 408 : 147—239.
- Guyton K. Z., Liu Y., Gorospe M., Xu Q., Holbrook N. J. 1996. Activation of mitogen-activated protein kinase by H_2O_2 . Role in cell survival following oxidant injury. J. Biol. Chem. 271 : 4138—4142.
- Hansson E., Ronnbäck L. 2003. Glial neuronal signaling in the central nervous system. FASEB J. 17 : 341—348.
- Kato F., Tanaka M., Nakamura K. 1999. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents. Toxicology In Vitro. 13 : 923—929.
- Kulahava T., Semenkova G., Kvacheva Z., Cherenkevich S. 2003. Menadione-dependent superoxide generation by C-6 glioma cells and lipopolysaccharide B effects. Clin. Laboratory. 49 : 557.
- Lee M., Yea S. S. 2000. Hydrogen peroxide inhibits the immune response to lipopolysaccharide by attenuating signaling through c-Jun N-terminal kinase and p38 associated with protein kinase C. Immunopharmacology. 48 : 165—172.
- Li Y., Zhu H., Kuppusamy P., Roubaud V., Zweier J. L., Trush M. A. 1998. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical by enzymatic and cellular systems. J. Biol. Chem. 273 : 2015—2023.
- Liberto C. M., Albrecht P. J., Herx L. M., Yong V. W., Levinson S. W. 2004. Proregenerative properties of cytokine-activated astrocytes. J. Neurochem. 89 : 1092—1100.
- Łuczak K., Balcerzyk A., Soszyński M., Bartosz G. 2004. Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells *in vitro*. Cell Biol. Int. 28 : 483—486.
- Martindale J. L., Holbrook N. J. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. J. Cell. Physiol. 192 : 1—15.
- Norton W. T., Aquino D. A., Hozumi I., Chiu F. C., Brosnan C. F. 1992. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. Neurochem. Res. 17 : 877—885.
- Pawate S., Shen Q., Fan F., Bhat N. R. 2004. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon- γ . J. Neurosci. Res. 77 : 540—551.
- Raivich G., Bohatschek M., Kloss C. U., Werner A., Jones L. L., Kreutzberg G. W. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. Brain Res. Brain Res. Rev. 30 : 77—105.
- Ridet J. L., Malhotra S. K., Privat A., Gage F. H. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. Trends Neurosci. 20 : 570—577.
- Schreck R., Baeuerle P. A. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF- κ B transcription factor and HIV-1. Trends Cell Biol. 1 : 39—42.
- Suzuki Y. J., Forman H. J., Sevanian A. 1997. Oxidants as stimulators of signal transduction. Free Rad. Biol. Med. 22 : 269—285.
- Tapping R. I., Tobias P. S. 1997. Cellular binding of soluble CD14 requires lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. J. Biol. Chem. 272 : 23 157—23 164.
- Tasaki K., Ruetzler C. A., Ohtsuki T., Martin D., Nawashiro H., Hallenbeck J. M. 1997. Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. Brain Res. 748 : 267—270.
- Torreilles F., Salman-Tabcheh S., Guérin M.-C., Torreilles J. 1999. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. Brain Res. Rev. 30 : 153—163.

Поступила 21 XII 2005

REGULATION OF MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF ASTROGLIAL CELLS
BY HYDROGEN PEROXIDE

T. A. Kulagova,¹ G. N. Semenkova,¹ Z. B. Kvacheva,² S. N. Cherenkevich¹

¹ Department of Biophysics, Physical Faculty, Belarusian State University,
Minsk 220050, Belarus;

² Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Republic of Belarus Ministry of Health, Minsk 220050, Belarus
e-mail: tatyana_kulagova@tut.by

Effects of hydrogen peroxide on morphological characteristics, proliferation index, menadione-dependent lucigenin-enhanced chemiluminescence of C6 glioma cells were studied. It was established that H₂O₂ at $1 \cdot 10^{-8}$ — $5 \cdot 10^{-7}$ M concentrations acts as a regulator of morphological and functional properties of astrocytes by inducing their reactivation that is manifested as a cell body hypertrophy and an increase of proliferative activity and of menadione-dependent production of superoxide (O₂^{•-}). Cytodestructive action of hydrogen peroxide at a concentration higher than 1 μM on C6 glioma cells shows itself as a decrease of their proliferation index and the ability to generate O₂^{•-} under menadione action. Using lipopolysaccharide B as a functional stimulator it has been shown that H₂O₂ modifies signaling pathways leading to the increase of mitotic activity of C6 glioma cells and decreases the yield of lucigenin-enhanced chemiluminescence of astrocytes under menadione action to the level of control values.

Key words: C6 glioma cells, hydrogen peroxide, lipopolysaccharide, proliferative index, chemiluminescence.
