

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА, СТРЕПТОКИНАЗЫ И ИХ ЭКВИМОЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ С ПИРУВАТКИНАЗОЙ НА КЛЕТКИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА IMR-32

© А. А. Романовская,¹ В. Н. Никандров

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск; ¹ электронный адрес: a-a-r@tut.by

Система экстраклеточного протеолиза, включающая в себя плазминоген (ПГ), его активную протеазу плазмин, активаторы ПГ и ингибиторы этих активаторов, оказывает влияние на функции клеток нервной ткани в норме и при патологии, их рост, дифференцировку и пролиферацию. Цель данного исследования — выявление и анализ эффектов экзогенного ПГ, его активатора стрептокиназы (СК), пируваткиназы (ПК) и их эквимольных комплексов на структурно-функциональные характеристики клеток нейробластомы IMR-32. Было установлено, что при культивировании культуры IMR-32 с исследуемыми агентами увеличиваются пролиферация и содержание нуклеиновых кислот и белка в клетках. Кроме того, низкая активность лактатдегидрогеназы в среде инкубирования клеток свидетельствует о том, что исследуемые белки препятствуют развитию дегенеративных изменений в культуре, которые связаны с депривацией сыворотки. Методом лизиса фибринового геля было показано, что в присутствии СК наблюдается увеличение ПГ-активаторной функции клеток, причем в комплексе с ПК через 3 сут эффект СК снимался. Таким образом, получены новые оригинальные факты, свидетельствующие о возможности инициирования малигнизации клеток и потенцирования опухолевого роста.

Ключевые слова: нейробластома, плазминоген, пируваткиназа, пролиферация, стрептокиназа.

Принятые сокращения: ЛДГ — лактатдегидрогеназа, ПГ — плазминоген, ПК — пируваткиназа, СК — стрептокиназа, IGF — инсулиноподобный фактор роста, PAI — ингибитор активатора плазминогена, tPA — тканевой тип активатора плазминогена, uPA — урокиназный тип активатора плазминогена, uPAR — рецептор к урокиназному активатору ПГ.

Исследования, проведенные в течение последних десятилетий, доказали важное значение некоторых протеаз для роста и развития ЦНС. Среди таковых нужно отметить систему экстраклеточного протеолиза «плазминоген—плазмин», которая помимо самого зимогена и его активной формы включает в себя активаторы плазминогена (ПГ) урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) типов и ингибиторы этих активаторов (PAI). Нейробластома стоит на втором месте по распространенности среди солидных опухолей у детей. Клетки нейробластомы секретируют uPA, tPA и PAI (Benjamin et al., 1989a). uPA связывается со специфическим рецептором (uPAR) и активирует ПГ, превращая его в плазмин, который участвует в тканевой деградации и протеолизе. Причем клетки с повышенной туморогенностью имеют более высокий уровень активности клеточно-ассоциированного активатора ПГ (Liu et al., 1984). Сам по себе ПГ существенно усиливает миграцию нейробластов (Puglianiello et al., 2000) и в концентрации $0.5 \cdot 10^{-7}$ М стимулирует пролиферацию клеток нейробластомы (Menouny et al., 1997). Стрептокиназа (СК) является продуктом жизнедеятельности представителя микрофлоры человека и животных β -гемолитического стрептококка групп А, С и G и сильнейшим активатором ПГ по «непротеиназному» пути. Однако свойства и эффекты данного белка изучены недостаточно.

Поскольку в живой системе белки не могут действовать изолированно, велика вероятность образования

межмолекулярных белковых комплексов, что может повлечь изменение их исходной биологической активности. Обнаружено, что ПГ и СК могут образовывать стабильные эквимольные комплексы с некоторыми ферментами углеводного обмена, в том числе с пируваткиназой (ПК) (Nikandrov et al., 1997). В экспериментах *in vitro* было показано, что данный фермент может модулировать электрофизиологические и метаболические параметры клеток нервной ткани (Никандров и др., 2003б; Романовская, 2005).

Цель настоящей работы — выявить характер влияния ПГ, СК и их эквимольных комплексов с ПК на структурно-функциональные характеристики клеток нейробластомы IMR-32.

Материал и методика

Реактивы. Очищенные образцы ПГ, полученные из фракции β -глобулинов аффинной хроматографией на лизин-Сефарозе, любезно предоставлены Н. С. Пыжовой (Институт эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ). Свойства используемого в работе ПГ описаны ранее (Nikandrov et al., 1997). ПК из мышцы кролика (ЕС 2.7.1.40) приобретена у фирмы Reanal (Венгрия), СК — производством ОАО «Белмедпрепараты» (Беларусь), NADH и пируват натрия — Sigma-Aldrich (США), остальные реактивы — производства стран СНГ.

Клеточная культура. Нейробластома IMR-32 была получена из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки выращивали на ростовой среде DMEM (Sigma, США), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Nucclone, Бельгия) и 10 мкг/мл гентамицина. Клетки пересеивали каждые 4—5 сут по достижении 90 % конfluence и инкубировали при 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂ при 90%-ной относительной влажности. Для эксперимента почти confluentные культуры снимали с поверхности культуральных сосудов при помощи смеси растворов версена и трипсина (1 : 3) и рассевали на чашки Петри (Sarstedt, США) диаметром 35 мм при плотности 50 000 клеток/см². В течение 24 ч клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, после чего эту питательную среду меняли на обедненную сывороточными белками (0.5 % эмбриональной телячьей сыворотки). На 3-и сут питательную среду в контроле меняли на бессывороточную, а в опытные чашки вносили бессывороточную среду, содержащую соответственно ПГ, ПК, СК либо эквивалентные комплексы ПГ—ПК или СК—ПК. Исследовали эффекты белков и их межмолекулярных комплексов в концентрации 10⁻⁷, 10⁻⁹ или 10⁻¹¹ М. Изучаемые агенты стерилизовали с помощью стерильных фильтров с диаметром пор 0.22 мкм. Эквивалентные комплексы готовили непосредственно перед использованием, смешивая необходимые количества белков, как описано ранее (Nikandrov et al., 1997). Результаты экспериментов регистрировали через 1 и 3 сут культивирования.

Жизнеспособность клеток оценивали по окраске трипановым синим (0.4%-ный раствор на фосфатном буфере, pH 7.2). Число окрашенных (неживых) и неокрашенных (живых) клеток подсчитывали в камере Горяева. Долю жизнеспособных клеток рассчитывали по формуле $A = (B - C)/B \cdot 100$, где A — доля жизнеспособных клеток (%), B — число всех клеток, C — число нежизнеспособных клеток. Индекс пролиферации (ИП) рассчитывали как отношение конечной концентрации клеток к исходной (посевой) концентрации.

Культуральную жидкость собирали в пробирки и центрифугировали в течение 5 мин при 150 g для осаждения клеток, утративших адгезию к пластику. В культуральной жидкости впоследствии определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а супернатант объединяли с клетками, которые снимали с чашек обычным способом, и проводили экстракцию нуклеиновых кислот.

Определение содержания ДНК, РНК и белка. В основе определения содержания нуклеиновых кислот лежит фракционирование по Шмидту и Тангаузеру (Schmidt, Thannhauser, 1945), которое сводится к последовательному удалению кислоторастворимой фракции, липидов и выявлению и определению с помощью щелочного и кислотного гидролизом нуклеиновых кислот и белка. К осадку клеток прибавляли 1 мл 0.3 М раствора HClO₄. Для полноты осаждения кислотонерастворимой фракции пробирки на 15 мин помещали в лед. Затем центрифугировали при 2000—3000 g 10—15 мин. Осадки дважды отмывали 0.1 М раствором HClO₄. Осадки суспендировали в 0.5 мл воды, затем добавляли 0.5 мл 0.6 М раствора КОН. Через 1 ч инкубации при 37 °С пробирки переносили в лед для остановки гидролиза. В каждую пробирку добавляли по 2 мл 0.6 М раствора HClO₄ и оставляли на 15 мин во льду. Центрифугировали 10 мин при 2000—3000 g. Надосадочную жидкость сливали для

определения содержания РНК. К осадку добавляли 2 мл 0.5 М HClO₄, слегка ресуспендировали и ставили для гидролиза на 20 мин в водяную баню при 80 °С, после чего в подготовленных таким образом пробах определяли содержание ДНК. Анализ содержания нуклеиновых кислот и белка проводили на спектрофотометре Cary-100 (Varian, Австралия). Обсчет результатов производили по приложению RNA/DNA к программному обеспечению Cary Win UV (2003 г.).

Активность ЛДГ (КФ 1.1.1.27) в среде культивирования клеток измеряли спектрофотометрически по известному методу (Koh, Choi, 1987). Исследуемые пробы (300 мкл) добавляли к свежеприготовленной субстрат-буферной смеси (0.76 mM пирувата натрия и 85 мкМ NADH в 0.1 М К-фосфатном буфере, pH 7.5) при комнатной температуре. Абсорбцию реакционной смеси при 340 нм измеряли спектрофотометрически в течение 1 мин, регистрируя падение концентрации NADH в ходе катализируемого ЛДГ превращения пирувата в лактат. Ферментативную активность выражали в нмольх NADH за 1 мин на 1 мг белка.

ПГ-активирующую способность клеток анализировали при помощи метода лизиса фибринового геля, содержащего ПГ, как описано ранее (Puzhova et al., 1996). Фибриновые пластины готовили в чашках Петри, смешивая 10 мл 0.3 %-ного раствора фибриногена человека, приготовленного на физиологическом растворе, и 0.2 мл раствора тромбина, приготовленного на дистиллированной воде. После образования геля пластины выдерживали 2 ч при комнатной температуре. Затем на поверхность геля наносили исследуемые образцы. Для постановки реакции клетки, преинкубированные в течение 1 или 3 сут с исследуемыми белками в концентрации 10⁻⁷ М, отмывали при 150 g в течение 5 мин, пипетировали в свежем DMEM и добавляли питательную среду, доводя концентрацию клеток до 2 млн/мл. Из полученной взвеси брали по 30 мкл суспензии и наносили на чашки Петри, покрытые слоем фибрина. Через 20 ч инкубации при 37 °С измеряли площадь зон лизиса (в мм²).

Спустя 24 или 72 ч после внесения исследуемых агентов культуры клеток просматривали в световом инвертированном фазово-контрастном микроскопе (OPTON, Германия).

Статистическая обработка. Все результаты представлены как среднее арифметическое и его стандартное отклонение из не менее чем трех независимых измерений, выполненные в трех повторностях. Статистическая значимость полученных результатов была оценена при помощи U-теста для непараметрических выборок. Различия считали значимыми при $P < 0.05$. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Statistica 6.0.

Результаты

Влияние культивирования нейробластомы IMR-32 с ПГ, ПК, СК либо комплексами ПГ—ПК или СК—ПК на пролиферацию клеток и содержание в них нуклеиновых кислот и белка. Через 24 ч ПГ в концентрации 10⁻⁷—10⁻⁹ М оказывал стимулирующее влияние на процессы биосинтеза, но не влиял на пролиферацию клеток. Содержание РНК и белка в этом случае возрастало соответственно на 38—55 и 27—49 %, а концентрация клеток не изменя-

Таблица 1

Содержание нуклеиновых кислот и белка в клетках нейробластомы человека IMR-32 и индекс пролиферации (ИП) через 1 сут культивирования с пируваткиназой (ПК), плазминогеном (ПГ), стрептокиназой (СК) и с эквивалентными комплексами ПГ—ПК или СК—ПК

| Концентрация исследуемых агентов, М | Содержание, мкг/мл, $\bar{x} \pm s_x$ | | | ИП |
|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|
| | РНК | ДНК | белок | |
| Контроль | 4.3 ± 0.32 | 3.25 ± 0.70 | 64.72 ± 6.79 | 1.2 ± 0.2 |
| Пируваткиназа | | | | |
| 10 ⁻⁷ | 7.63 ± 0.24 ^a | 4.36 ± 0.73 | 106.06 ± 2.52 ^a | 1.5 ± 0.1 |
| 10 ⁻⁹ | 6.92 ± 0.36 ^a | 4.28 ± 1.53 | 97.14 ± 16.00 ^a | 1.3 ± 0.2 |
| 10 ⁻¹¹ | 6.58 ± 1.37 ^a | 4.04 ± 0.78 | 95.64 ± 2.85 ^a | 1.2 ± 0.1 |
| Плазминоген | | | | |
| 10 ⁻⁷ | 5.93 ± 0.56 ^a | 4.43 ± 0.58 | 82.08 ± 2.58 ^a | 1.6 ± 0.3 |
| 10 ⁻⁹ | 6.69 ± 0.76 ^a | 3.65 ± 0.61 | 96.65 ± 10.25 ^a | 1.3 ± 0.2 |
| 10 ⁻¹¹ | 5.24 ± 0.61 | 3.94 ± 0.56 | 80.65 ± 4.62 ^a | 1.2 ± 0.2 |
| Плазминоген—пируваткиназа | | | | |
| 10 ⁻⁷ | 5.94 ± 0.79 ^{a,b} | 3.94 ± 0.88 | 96.52 ± 5.12 ^{a,b} | 1.5 ± 0.1 |
| 10 ⁻⁹ | 5.29 ± 0.12 ^{a,b} | 3.73 ± 0.25 | 86.31 ± 1.04 ^a | 1.3 ± 0.1 |
| 10 ⁻¹¹ | 5.31 ± 0.74 | 3.41 ± 0.06 | 87.72 ± 6.65 ^a | 1.3 ± 0.2 |
| Стрептокиназа | | | | |
| 10 ⁻⁷ | 5.64 ± 0.09 ^a | 4.53 ± 0.46 ^a | 93.56 ± 3.94 ^a | 1.8 ± 0.3 ^a |
| 10 ⁻⁹ | 5.33 ± 0.37 ^a | 4.37 ± 0.25 ^a | 92.90 ± 4.72 ^a | 1.5 ± 0.2 |
| 10 ⁻¹¹ | 5.50 ± 1.03 | 3.89 ± 0.50 | 87.97 ± 0.54 ^a | 1.2 ± 0.2 |
| Стрептокиназа—пируваткиназа | | | | |
| 10 ⁻⁷ | 6.48 ± 0.21 ^{a,b} | 3.06 ± 0.31 | 90.69 ± 5.36 ^{a,b} | 1.2 ± 0.1 |
| 10 ⁻⁹ | 6.18 ± 0.65 ^a | 2.95 ± 0.89 | 88.21 ± 11.93 ^a | 1.1 ± 0.1 |
| 10 ⁻¹¹ | 5.39 ± 0.55 ^a | 3.01 ± 0.40 | 91.54 ± 8.18 ^a | 1.1 ± 0.2 |

^a Отличия от контроля достоверны. ^б Отличия влияния эквивалентного комплекса от действия агентов, входящих в состав комплекса, достоверны. ^в Отличия от действия эквивалентной концентрации ПК достоверны. Достоверность различий оценивали при помощи критерия Манна—Уитни для непараметрических выборок ($P < 0.05$).

лась. При действии СК в концентрации 10⁻⁷–10⁻⁹ М уровень ДНК вырос на 34–39 %, РНК — на 24–30, белка — на 43–45 % в сравнении с контролем. Статистически значимое увеличение индекса пролиферации (ИП) на 50 % наблюдалось лишь при влиянии 10⁻⁷ М СК. Действие СК, а также ПГ в концентрации 10⁻¹¹ М не вызывало значимых изменений в содержании нуклеиновых кислот и концентрации клеток по сравнению с контролем. Для клеток, выращенных в присутствии 10⁻⁷–10⁻¹¹ М ПК, содержание РНК выросло на 53–77, белка — на 48–64 %. Концентрация клеток была на 25 % выше контрольных показателей только в случае влияния 10⁻⁷ М ПК, однако значения ИП не отличались от контроля. Эффект эквивалентного комплекса ПГ—ПК был сходен с действием ПГ. Комплекс СК—ПК вызывал увеличение содержания РНК в клетках на 25–50 и белка на 36–40 %. Эффект этого комплекса на содержание ДНК и численность клеток не отличался от контроля (табл. 1).

Через 3 сут в контрольных культурах нейробластомы, которые культивировали в питательной среде без сывороточных белков, наблюдали угнетение биосинтетических процессов и остановку клеточной пролифера-

ции. Уровни ДНК и белка остались такими же, как и через 24 ч, а содержание РНК снизилось на 50 %. Эти данные, видимо, объясняются тем, что раковые клетки характеризуются высокой скоростью метаболизма и нуждаются в питательных веществах и ростовых факторах, содержащихся в эмбриональной телячьей сыворотке. Под воздействием ПГ во всех исследуемых концентрациях содержание ДНК выросло на 21–61 %, РНК — 71–118, белка — на 38–88 % по сравнению с контролем. ПГ способствовал поддержанию пролиферативной активности клеток, что подтверждается увеличением ИП на 45–91 %. СК также способствовала поддержанию жизнедеятельности клеток нейробластомы IMR-32. Так, после 3 сут воздействия СК содержание ДНК выросло на 41–185, РНК — на 41–90 % (влияние СК в концентрации 10⁻¹¹ М на уровень РНК не отличалось от контроля), концентрация клеточного белка увеличилась на 53–145, а ИП увеличился на 54–154 % в сравнении с контролем. Нужно отметить, что содержание РНК в данном случае осталось на уровне значений 1-х сут культивирования. Добавка в питательную среду ПК в любой из исследованных концентраций вела к росту содержа-

Таблица 2

Содержание нуклеиновых кислот и белка в клетках нейробластомы человека IMR-32 и индекс пролиферации (ИП) через 3 сут культивирования с пируваткиназой (ПК), плазминогеном (ПГ), стрептокиназой (СК) и с эквимоллярными комплексами ПГ—ПК или СК—ПК

| Концентрация исследуемых агентов, М | Содержание, мкг/мл, $\bar{x} \pm s_x$ | | | ИП |
|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | РНК | ДНК | белок | |
| Контроль | 2.87 ± 0.11 | 3.37 ± 0.20 | 56.39 ± 3.25 | 1.1 ± 0.1 |
| Пируваткиназа | | | | |
| 10 ⁻⁷ | 9.51 ± 0.57 ^a | 12.85 ± 2.28 ^a | 203.70 ± 17.26 ^a | 4.1 ± 0.3 ^a |
| 10 ⁻⁹ | 9.31 ± 0.43 ^a | 12.30 ± 1.73 ^a | 198.91 ± 17.82 ^a | 3.9 ± 0.1 ^a |
| 10 ⁻¹¹ | 7.77 ± 1.65 ^a | 7.82 ± 3.43 ^a | 141.88 ± 45.63 ^a | 2.8 ± 0.2 ^a |
| Плазминоген | | | | |
| 10 ⁻⁷ | 6.25 ± 1.07 ^a | 4.74 ± 0.97 ^a | 92.55 ± 9.61 ^a | 1.8 ± 0.1 ^a |
| 10 ⁻⁹ | 6.55 ± 1.66 ^a | 5.42 ± 1.57 ^a | 105.94 ± 26.95 ^a | 2.1 ± 0.1 ^a |
| 10 ⁻¹¹ | 4.91 ± 0.38 ^a | 4.09 ± 0.86 | 78.05 ± 10.36 ^a | 1.6 ± 0.2 ^a |
| Плазминоген—пируваткиназа | | | | |
| 10 ⁻⁷ | 11.42 ± 1.59 ^{a,г} | 6.50 ± 2.85 ^{a,в} | 142.30 ± 32.79 ^{a,б} | 3.2 ± 0.3 ^{a,б} |
| 10 ⁻⁹ | 8.99 ± 0.87 ^a | 4.20 ± 0.68 | 123.59 ± 11.75 ^{a,в} | 2.5 ± 0.3 ^{a,в} |
| 10 ⁻¹¹ | 5.75 ± 1.36 ^a | 2.48 ± 1.12 | 75.39 ± 13.38 | 1.5 ± 0.3 |
| Стрептокиназа | | | | |
| 10 ⁻⁷ | 5.47 ± 1.22 ^a | 9.62 ± 1.07 ^a | 138.42 ± 15.50 ^a | 2.8 ± 0.1 ^a |
| 10 ⁻⁹ | 4.06 ± 1.02 ^a | 5.75 ± 0.67 ^a | 90.57 ± 5.01 ^a | 1.8 ± 0.2 ^a |
| 10 ⁻¹¹ | 3.07 ± 0.11 | 4.74 ± 0.69 ^a | 86.06 ± 6.08 ^a | 1.7 ± 0.2 ^a |
| Стрептокиназа—пируваткиназа | | | | |
| 10 ⁻⁷ | 8.78 ± 0.62 ^{a,д} | 6.83 ± 2.00 ^{a,в} | 9141.3 ± 14.30 ^{a,в} | 2.8 ± 0.2 ^{a,в} |
| 10 ⁻⁹ | 6.80 ± 2.03 ^{a,в} | 3.39 ± 0.33 | 90.52 ± 18.22 ^{a,в} | 1.8 ± 0.2 ^{a,в} |
| 10 ⁻¹¹ | 5.60 ± 0.49 ^{a,в} | 3.11 ± 0.12 | 79.07 ± 4.56 ^{a,в} | 1.6 ± 0.2 ^{a,в} |

^a Отличия от контроля достоверны. ^б Отличия влияния эквимоллярного комплекса от действия агентов, входящих в состав комплекса, достоверны. ^в Отличия от действия эквивалентной концентрации ПК достоверны. ^г Отличия достоверны в сравнении с влиянием ПГ. ^д Отличия достоверны в сравнении с влиянием СК. Достоверность различий оценивали при помощи критерия Манна—Уитни для непараметрических выборок ($P < 0.05$).

ния ДНК на 132—281 %, РНК — на 171—231, белка — на 154—273 % и к увеличению ИП соответственно на 154—273 %. Добавка к среде культивирования нейробластомы комплекса ПГ—ПК в концентрации 10⁻⁷ М вызвала увеличение содержания ДНК на 93 %, РНК — на 298, белка — на 152, ИП — на 191 %, а в концентрации 10⁻⁹ М вела к росту РНК на 213 %, белка — на 119, ИП — на 127 % в сравнении с контролем. Концентрация ДНК в этом случае выросла незначительно по сравнению с контролем. Влияние комплекса в концентрации 10⁻¹¹ М не отличалось от контроля, за исключением повышенного (на 100 %) содержания РНК. Комплекс СК—ПК на 3-и сут способствовал увеличению содержания РНК на 95—206 %, ДНК — на 102 (только в концентрации 10⁻⁷ М), белка — на 40—150 % в сравнении с контролем. Причем содержание исследуемых макромолекул в клетках после 3 сут влияния комплекса СК—ПК в концентрациях 10⁻⁹ и 10⁻¹¹ М не изменялось в сравнении с 1-ми сут. Увеличение ИП под влиянием означенного комплекса в концентрации 10⁻⁷—10⁻¹¹ М составило 45—154 % по сравнению с контролем (табл. 2).

Очевидно, что при интеграции белков в межмолекулярные комплексы эффекты, оказываемые ими по отдельности на содержание нуклеиновых кислот и белка в клетках, а также клеточную пролиферацию, могут изменяться. Так, через 1 сут инкубации IMR-32 с ПГ, ПК либо их комплексом ПГ—ПК наблюдали увеличение содержания РНК и белка. Причем содержание этих биомолекул в клетках, которые выращивали в присутствии ПК в концентрации 10⁻⁷ М, было выше, чем аналогичные показатели для клеток, выращенных в присутствии ПГ и комплекса ПГ—ПК. Концентрация ДНК в клетках, подвергшихся действию ПК и эквимоллярного комплекса СК—ПК, не отличалась от контроля, тогда как СК в концентрации 10⁻⁷—10⁻⁹ М вызвала значимое увеличение содержания не только РНК с белком, но и ДНК, а также ИП.

Через 3 сут содержание РНК в клетках, которые культивировали в среде с содержанием комплекса ПГ—ПК в концентрации 10⁻⁷ М, было таким же, как и для нейробластомы, выращенной в среде с 10⁻⁷ М ПК, и выше, чем у клеток в присутствии ПГ в той же концентрации. Содер-

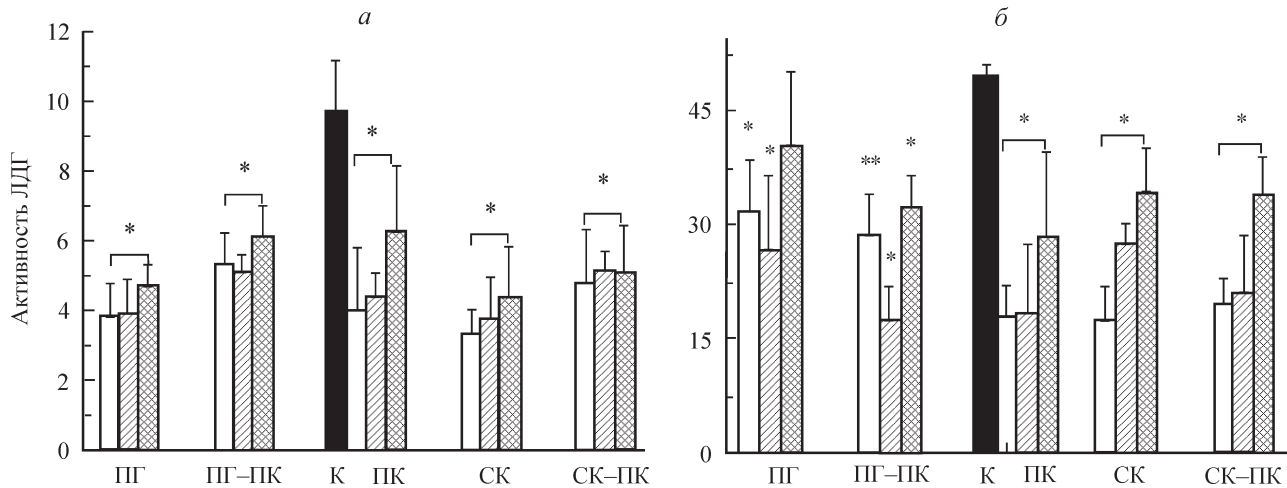


Рис. 1. Активность ЛДГ в кондиционированной среде клеток нейробластомы IMR-32 через 1 (а) и 3 (б) сут культивирования с ПГ, СК, ПК или с их эквимольными комплексами.

Активность ЛДГ выражена в нМ NADH за 1 мин на 1 мг белка; одна звездочка означает достоверное различие между контрольной группой и группами, на которые воздействовали исследуемыми белками; две звездочки означают достоверность различия опытных групп по сравнению с группой культур, обработанных ПК. Различия определяли по критерию Манна—Уитни ($P < 0.05$).

жание же ДНК в культурах, выращенных в присутствии комплекса, не отличалось от такового для клеток, культивировавшихся в присутствии ПГ. Содержание белка было выше, чем при культивировании клеток с ПГ, но ниже, чем с ПК. ИП также был ниже, чем в случае с ПК, но выше, чем в случае с ПГ. Комплекс СК—ПК в концентрации 10^{-7} М способствовал увеличению концентрации клеточной РНК в большей степени, чем одна СК. Остальные показатели были примерно на уровне тех значений, которые регистрировали при действии одной СК, и отличными от вызываемых ПК (табл. 2).

Влияние ПГ, ПК, СК, ПГ—ПК и СК—ПК на жизнеспособность клеток нейробластомы и активность ЛДГ в среде культивирования. Через 1 сут культивирования жизнеспособность клеток была на уровне 90—98 % и значимых различий между контрольными и опытными пробами не было. На 3-и сут в контроле жизнеспособность упала до 35 %, в то время как в культурах, в среду культивирования которых были

внесены исследуемые белки, жизнеспособность достигала 80—98 % в зависимости от природы и концентрации агента.

В контроле повышенный уровень активности ЛДГ в среде культивирования нейробластомы IMR-32 регистрировали уже через 24 ч. Он возрастал через 3 сут в 5 раз, тогда как в среде с содержанием исследуемых агентов регистрировали снижение активности экстраклеточной ЛДГ в сравнении с контролем на протяжении всего времени наблюдения. Исключение составило влияние ПГ в концентрации 10^{-11} М: в этом случае значение активности внеклеточной ЛДГ было выше, чем в остальных вариантах опытов, и не отличалось от контроля. На 3-и сут культивирования активность ЛДГ в среде культивирования с ПГ и его комплексом с ПК в концентрации 10^{-7} М была несколько выше, чем аналогичные показатели в культурах, подвергшихся воздействию ПК, СК либо их комплекса. Других межгрупповых различий в показателях активности экстраклеточной ЛДГ не было зарегистрировано (рис. 1).

Морфология клеток нейробластомы при культивировании с ПГ, ПК, СК или их эквимольными комплексами. В контрольной культуре клеток нейробластомы регистрировали значительное количество округлых и плавающих клеток, отростки у клеток практически отсутствовали, имеющие же отростки были очень короткими. В клеточном монослое, выращенном в присутствии 10^{-7} М ПГ, округлые и плавающие клетки встречались крайне редко, наблюдали признаки дифференцировки клеток и формирование длинных (более 50 мкм) отростков. В культурах, которые культивировали 3 сут в присутствии СК, наблюдали появление небольшого количества округлых клеток, отростки были короче, чем у клеток, на которые воздействовали ПГ. Комплекс СК—ПК более эффективно, нежели одна СК, предотвращал нарастание пагубных изменений в культуре. В культурах IMR-32, выращенных в присутствии ПК или комплекса ПГ—ПК в концентрации 10^{-7} М, клетки формировали плотный монослой, округлые и плавающие клетки отсутствовали (рис. 2).

Таблица 3

ПГ-зависимая фибринолитическая активность клеток нейробластомы человека IMR-32 после их культивирования с ПГ, ПК, СК или с их эквимольными комплексами ПГ—ПК и СК—ПК

| Добавки в среду культивирования | Зоны фибринолиза через 1 сут, мм ² , $\bar{x} \pm s_x$ | Зоны фибринолиза через 3 сут, мм ² , $\bar{x} \pm s_x$ |
|---------------------------------|---|---|
| Контроль | 34 ± 3 | 34 ± 3 |
| ПК | 35 ± 13 | 39 ± 3 |
| ПГ | 29 ± 6 | 38 ± 9 |
| СК | 105 ± 21 ^а | 205 ± 17 ^б |
| ПГ—ПК | 27 ± 9 | 51 ± 15 |
| СК—ПК | 93 ± 14 ^а | 50 ± 14 |

^а Отличия от контроля достоверны. ^б Отличия достоверны в сравнении с 1 сут инкубации. Достоверность различий оценивали при помощи критерия Манна—Уитни для непараметрических выборок ($P < 0.05$). Концентрация агента во всех случаях была 10^{-7} М.

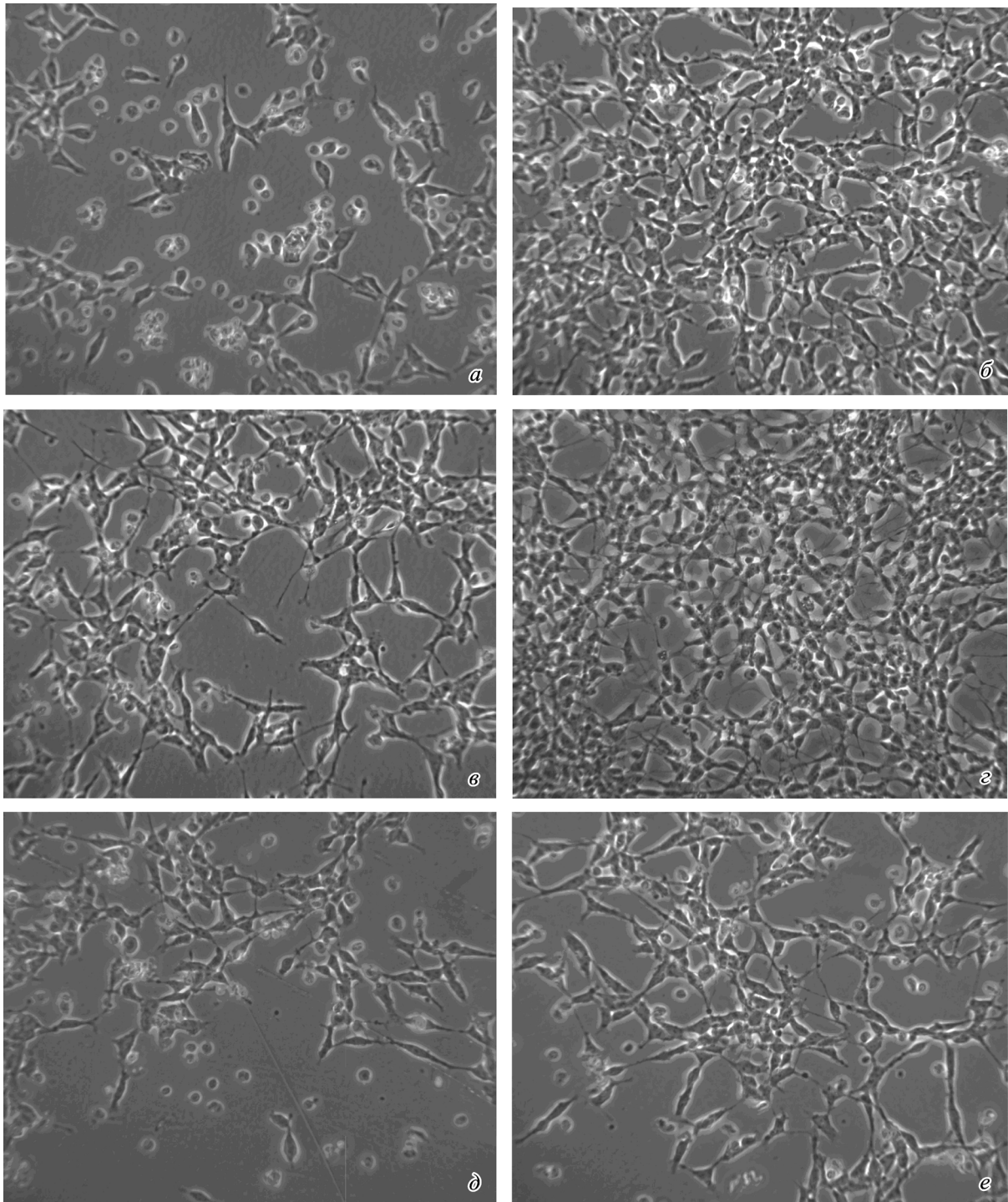


Рис. 2. Микрофотографии клеток нейробластомы IMR-32 через 3 сут культивирования в бессывороточной среде (а) и в среде, содержащей различные добавки в концентрации 10^{-7} М (б—е).

б — ПК, в — ПГ, г — эквимолярный комплекс ПГ—ПК, д — СК, е — эквимолярный комплекс СК—ПК. Фазовый контраст. Об. 16х.

Влияние ПГ, ПК, СК и их эквимолярных комплексов на ПГ-активирующую функцию клеток нейробластомы IMR-32. Известно, что клетки нейробластомы секретируют 2 активатора ПГ — uPA и tPA (Seeger et al., 1977; Benjamin et al., 1989), поэтому анализировали, как изменяется ПГ-активаторная потенция клеток при их культивировании с исследуемыми белками на различных сроках наблюдения. Было отмечено, что выращивание культуры в присутствии ПК и

ПГ, а также их комплекса никак не влияло на способность клеток активировать ПГ. При выращивании нейробластомы в присутствии СК наблюдали увеличение способности клеток активировать ПГ в 3 раза через 1 сут и в 6 раз через 3 сут культивирования. Комплекс СК—ПК вызывал увеличение зоны лизиса в 2.7 раза только через 1 сут, а далее его действие не отличалось от контроля (табл. 3).

Обсуждение

Система плазминоген—плазмин играет ключевую роль в регуляции клеточной пролиферации и миграции во время эмбрионального развития, а также при метастазировании и опухолевой инвазии (Dana et al., 1985; Valinsky, Le Douarin, 1985). В настоящей работе было получено подтверждение участия данной системы в жизнедеятельности клеток нейробластомы человека. Так, в течение всего времени культивирования клеток в присутствии ПГ регистрировали более высокое содержание ДНК, РНК и белка, а также увеличение численности клеток и индекса пролиферации по сравнению с контролем, что указывает на стимуляцию пролиферации клеток нейробластомы. Ранее было установлено (Menouny et al., 1997), что митогенный эффект ПГ снимается в присутствии блокатора рецептора к инсулиноподобному фактору роста (IGF) и в присутствии анти-IGF-II-антител. Таким образом, по всей вероятности, эффект ПГ на пролиферацию клеток опосредуется через IGFs, в нашем случае — через IGF-II, так как именно он продуцируется клетками нейробластомы (El-Badry et al., 1989). Влияние же IGFs на пролиферацию четко установлено (El-Badry et al., 1991). По свидетельству японских ученых (Nakagima, Namanoue, 1994), нейроны экспрессируют на своей поверхности α -енолазу, которая является рецептором к ПГ. Неизвестно, имеется ли α -енолаза на клетках нейробластомы, но точно установлено, что эти клетки экспрессируют амфотерин, а ПГ, равно как и tPA, может формировать комплекс с амфотерином посредством лизинсвязывающих сайтов, что вызывает ускорение активации ПГ (Parkkinen, Rauvala, 1991). Активированный ПГ способен оказывать влияние на микроокружение клетки, в том числе и на активацию IGF-II. Помимо этого, в культурах, инкубированных в присутствии ПГ, регистрировали более низкую активность ЛДГ в среде инкубации, что указывает на способность ПГ предотвращать нарушение целостности клеточной мембраны и в конечном итоге препятствовать гибели клеток, что подтверждается результатами исследования жизнеспособности клеток нейробластомы. Данные согласуются с таковыми полученными нами ранее на культуре крысиной феохромоцитомы РС12, о том, что ПГ в концентрации 10^{-6} — 10^{-7} М способствует повышению числа жизнеспособных клеток этой линии при культивировании в бессывороточной среде (Никандров и др., 2002). Учитывая, что гибель клеток в среде, не содержащей сыворотки, обусловлена главным образом активацией свободнорадикальных процессов (Соколова и др., 2005), мы предполагаем, что нарушенная у ПГ слабая конвергирующая супероксид способность (Никандров, Пыжова, 2003) препятствует нарастанию проявления окислительного стресса в среде, лишенной сыворотки. В данной работе впервые было изучено влияние СК — активатора ПГ — на клетки нейробластомы. Добавка СК также поддерживает пролиферацию и жизнеспособность клеток в среде с дефицитом сывороточных белков. Предыдущие исследования эффектов СК на нервную ткань (Никандров и др., 2003а; Никандров, Жук, 2005) показали, что СК способна воздействовать на клетки непосредственно, минуя кровоток, что позволило нам отнести СК к регуляторным белкам. Причем результат действия СК зависит от клеточного типа и состояния клеток, в частности от степени зрелости ткани. Есть основания думать, что действие СК имеет триггерный характер и может быть направлено на

стабилизацию структуры и функции клетки, что выражается в увеличении жизнеспособности клеток в неблагоприятных условиях. В присутствии ПК пролиферация клеток нейробластомы проходила еще более активно, чем в присутствии ПГ и СК. Надо заметить, что ранее было зафиксировано угнетающее действие ПК (особенно в концентрации 10^{-7} М) на клетки крысиной глиомы С6 (Романовская, 2005), что указывает на зависимость эффектов, вызываемых ПК, от типа клеток. Тот факт, что СК или ПК в наномолярной концентрации способны действовать на пролиферацию и жизнеспособность клеток, закономерно ставит вопрос о механизмах их действия. Однако вопрос этот до конца не выяснен. Маловероятно, что такое ничтожно малое количество белка, которое мы вносили в клеточную систему, при своем разрушении могло восполнить клеткам дефицит аминокислот. Возможно, что эти белки могут связываться с какими-то структурами на клеточной поверхности (рецепторами), вызывая активацию генов, отвечающих за клеточную пролиферацию. Не исключено также и нерепреципитное действие данных агентов на клетки. Так, учитывая, что даже в такой малой концентрации, как 10^{-11} М, на 3-и сут культивирования с ПК или СК регистрируется увеличение содержания ДНК, РНК и белка, а также прирост численности клеток, можно предположить участие механизмов, включающих в себя изменения трансмембранных ионных потоков, в частности ионов Ca^{2+} , в проявлении эффектов исследуемых белков. Однако этот вопрос является предметом дальнейших исследований.

Таким образом, в ходе исследования получены новые оригинальные факты, свидетельствующие о возможности инициирования малигнизации клеток и потенцирования опухолевого роста.

Работа выполнена при поддержке гранта Президиума НАН Беларуси (№ 2006324).

Список литературы

- Никандров В. Н., Жук О. Н. 2005. Влияние стрептокиназы на развитие клеток коры головного мозга крыс *in vitro*. Морфология. 128 (5) : 33—36.
- Никандров В. Н., Петрусенко Г. П., Гронская Р. И. 2003а. Состояние АТФ- и Ca^{2+} -зависимого протеолиза в клетках феохромоцитомы РС12 при действии стрептокиназы и фактора роста нервов. Изв. НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. 4 : 84—87.
- 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. 2002. Действие компонентов перичеселлюлярного протеолиза на клетки нервной ткани. Достижения медицинской науки Беларуси. 7 : 49—50.
- Никандров В. Н., Пыжова Н. С. 2003. Регуляторные белки: функциональные свойства молекул и механизмы их биологического действия. Изв. НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. 3 : 75—89.
- 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. 2003б. Модуляция центральной респираторной активности с помощью плазминогена, стрептокиназы и их комплексов с пируваткиназой. Нов. мед.-биол. наук. 2 : 40—43.
- Романовская А. А. 2005. Действие различных концентраций пируваткиназы на рост клеток глиомы С6. Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. 5 : 38—41.

Соколова Т. В., Фуряев В. В., Юрлова Л. А., Аврова Н. Ф. 2005. Влияние ганглиозида GM1 на внутриклеточную концентрацию свободного кальция и жизнеспособность клеток PC12 при индукции окислительного стресса. Нейрохимия. 22 (4) : 266—272.

Benjamin L. A., McGarry R. C., Hart D. A. 1989a. Alterations in plasminogen activator and inhibitor activity during the differentiation of a human neuroblastoma cell line, SMS-KAN. Cancer Lett. 44 : 101—108.

Benjamin L. A., McGarry R. C., Hart D. A. 1989b. Effect of retinoic acid on human neuroblastoma: correlation between morphological differentiation and changes in plasminogen activator and inhibitor activity. Cancer Chemother. Pharmacol. 25 : 25—31.

Dana K., Andreasen P. A., Grendahl-Hansen J., Kristensen P., Nielsen L. S., Ckriver L. 1985. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. Adv. Cancer. Res. 44 : 139—266.

El-Badry O., Helman L. J., Chatten J., Steinberg S. M., Evans A. E., Israel M. A. 1991. Insulin-like growth factor II-mediated proliferation of human neuroblastoma. J. Clin. Invest. 87 : 648—657.

El-Badry O., Romanus J. A., Helman L. J., Cooper M. J., Reczler M. M., Israel M. A. 1989. Autonomous growth of a human neuroblastoma cell line is mediated by insulin-like growth factor II. J. Clin. Invest. 84 : 829—839.

Koh J. Y., Choi D. W. 1987. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J. Neurosci. Methods. 20 : 83—90.

Liu H. Y., Yang P. P., Toledo D. L., Mangel W. F. 1984. Modulation of cell-associated plasminogen activator activity by cocultivation of a stem cell and its tumorigenic descendant. Mol. Cell. Biol. 4 : 160—165.

Menouny M., Binoux M., Babajko S. 1997. Role of insulin-like growth factor binding protein-2 and its limited proteolysis in neu-

roblastoma cell proliferation: modulation by transforming growth factor-beta and retinoic acid. Endocrinology. 138 : 683—690.

Nakagima K., Hamanoue M. 1994. Plasminogen binds specifically to α -enolase on rat neuronal plasma membrane. J. Neurochem. 63 : 2048—2057.

Nikandrov V. N., Murashko O. N., Vorobyova G. V., Pyzhova N. S., Kvyatkovskaya N. V., Bartalevich O. A. 1997. Integration of human plasminogen or streptokinase into stable complexes with oxidoreductases and pyruvate kinase. Letters Pept. Sci. 4 : 497—502.

Parkkinen J., Rauvala H. 1991. Interaction of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphoterin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphoterin. J. Biol. Chem. 266 : 16 730—16 735.

Puglianiello A., Germani D., Rossi P., Cianfarani S. 2000. IGF-I stimulates chemotaxis of human neuroblasts. Involvement of type 1 IGF receptor. IGF binding proteins, phosphatidylinositol-3 kinase pathway and plasmin system. J. Endocrinol. 165 : 123—131.

Pyzhova N. S., Nikandrov V. N., Nikandrov N. N. 1996. Effect of active oxygen species scavengers on fibrinolytic activity of some proteinases. Thromb. Res. 82 : 303—312.

Schmidt G., Thannhauser S. J. 1945. A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphorprotein in animal tissues. J. Biol. Chem. 161 : 83—89.

Seeger R. C., Rayner S. A., Banerjee A., Chung H., Laug W. E., Neustein H. B., Benedict W. F. 1977. Morphology, growth, chromosomal pattern, and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines. Cancer Res. 37 : 1364—1371.

Valinsky J. E., Le Douarin N. M. 1985. Production of plasminogen activator by migrating cephalic neural crest cells. EMBO J. 4 : 1403—1406.

Поступила 23 VIII 2006

EFFECTS OF PLASMINOGEN, STREPTOKINASE AND THEIR EQUIMOLAR COMPLEXES WITH PYRUVATE KINASE ON THE HUMAN NEUROBLASTOMA IMR-32 CELLS

A. A. Romanovskaya,¹ V. N. Nikandrov

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

¹ e-mail: a-a-r@tut.by

The system of extracellular proteolysis, consists of plasminogen (PGn), its active protease (plasmin), PGn activation and PGn activators inhibitors, influences the nervous tissue functions, their growth, differentiation and proliferation in both, normal and pathological conditions. The purpose of the investigation was to study the effects of exogenous PGn, its activator streptokinase (SK), PK and their equimolar complex on the morpho-functional state neuroblastoma IMR-32 cells. PGn, SK, PK and their complexes stimulated cells proliferation during 1—3 days of incubation, shown by cell quantity increase. We also observed DNA, RNA and protein increase. The low lactate dehydrogenase efflux was evidence of that an addition of the proteins under investigation in the culture medium prevented the development of degenerative alterations connected with serum deprivation. The levels of extracellular PGn-activator activity, as measured by the biochemical fibrinolytic assay, increased over SK. This SK effect vanished on the 3rd day when SK formed complexes with PK. New original facts obtained testify the probability of initiation of neoplastic transformation and tumor growth potentiation.