

Стрептокиназа и плазминоген в биотехнологии клеток нервной ткани

В.Н. Никандров, О.Н. Жук

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Streptokinase and Plasminogen in Biotechnology of Nervous Tissue Cells

V.N. Nikandrov, O.N. Zhuk

Scientific-Research Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus Republic

Обобщены результаты собственных исследований роли плазминогена и стрептокиназы в жизнедеятельности клеток нервной ткани в органотипических диссоциированных культурах чувствительных и симпатических ганглиев, неокортекса, а также перевиваемых линий глиомы С6, нейробластомы IMR-32 и феохромоцитомы PC12.

В дефицитной по белкам сыворотки крови питательной среде плазминоген и стрептокиназа стимулировали жизнеспособность клеток и в концентрации 10^{-7} – 10^{-10} М защищали клетки чувствительных, симпатических ганглиев, неокортекса и перевиваемых линий от повреждающего действия H_2O_2 (0,0001М), NH_4Cl (0,01 М), глутамата, АТФ (0,001 М) в анионной форме и охлаждения. Даже кратковременная экспозиция (20 мин) клеток глиомы С6 или феохромоцитомы PC12 с этими белками в концентрации 10^{-9} М вела к резким изменениям перичеллюлярного или внутриклеточного АТФ- или Ca^{2+} -активируемого протеолиза. В присутствии изучаемых белков активировались биосинтетические процессы в клетках нервной ткани, изменялась их энзиматическая активность.

Исследуемые белки в ряде случаев ускоряли созревание культур ткани, улучшали адгезивность, обеспечивали высокую жизнеспособность, увеличивали количество отростков и их арборизацию. Электронная микроскопия выявила характер структурных перестроек клеток нервной ткани, отражающих нейротрофические свойства плазминогена или стрептокиназы. Стрептокиназа способна регулировать водно-электролитный баланс клетки.

Обсуждается значение полученной совокупности результатов в фундаментальном и прикладном аспектах, включая проблемы биотехнологии нервной ткани.

Ключевые слова: нервная ткань, культуры клеток, пролиферация, ультраструктура, метаболическая активность, протекторный эффект, плазминоген, стрептокиназа.

В числе глобальных проблем биотехнологии, инженерии клетки и биологии в целом на современном этапе четко определилась необходимость масштабной наработки значительной массы жизнеспособных и функционально активных клеток тканей животных и человека, включая высококодифференцированную и полиморфную нервную ткань.

Применительно к нервной ткани подобная ситуация продиктована следующей совокупностью задач:

1. Нарботкой вакцин для профилактики нейровирусных инфекций, целесообразностью получения ряда специфических для нервной ткани продуктов жизнедеятельности, например, нейроспецифических белков. Здесь следует отметить, что выделение последних диктует необходимость культивирования клеток нервной ткани на питательных средах максимально определенного состава. Особенно важно резкое уменьшение в средах содержания белков сыворотки крови, присутствие которых (и продуктов

The results of own researches of a role of plasminogen, streptokinase in vital activity of nervous tissue cells at organotypic and dissociated cultures of sympathetic and sensory ganglia, neocortex, and also at transplanted lines of glioma C6, neuroblastoma IMR-32 and pheochromocytoma PC12 are generalized.

Plasminogen or streptokinase in protein-deficient media stimulated the vital functions of cells and in concentrations 10^{-7} – 10^{-10} M protected cells of sensitive, sympathetic ganglia, neocortex and continues cell lines under damaging actions of H_2O_2 (0,0001M), NH_4Cl (0,01 M), glutamate, ATP (0,001 M) in anionic form and cooling. Even a short-term exposition (20 min) of glioma C6 or PC12 cells with both proteins in the concentration 10^{-9} M led to sharp alterations in pericellular or intracellular ATP- or Ca^{2+} -activated proteolysis. In the presence of the proteins in study the intracellular biosynthesis processes were activated, enzymatic activity of cells was changed.

The proteins under investigation in number of cases provided acceleration of cultured tissue maturation, improvement of cell adhesiveness, high survival rate, increase in quantity and length of processes and their arborisation. Electronic microscopy established the character of structural rearrangements of nervous tissue cells, reflecting the neurotrophic properties of plasminogen and streptokinase. Streptokinase was able to regulate the water-electrolytic balance of cell.

The importance of obtained totality of the results are discussed in fundamental and applied aspects, including the problems of nervous tissues biotechnology.

Key words: nervous tissue, cell cultures, proliferation, ultrastructure, metabolic activity, protective effect, plasminogen, streptokinase.

их деградации) существенно усложняет и удорожает биохимическую очистку целевых продуктов. Между тем, культивирование клеток нервной ткани традиционно ведется (и, как правило, наиболее эффективно) как раз на питательных средах, обогащенных белками сыворотки крови. Содержание сыворотки крови в них может достигать 25%. С другой стороны, получение разнообразных тканеспецифических белков с использованием рекомбинантных ДНК не всегда успешно, да и цена генно-инженерных белков не отличается серьезным удешевлением. Это заставляет искать иные регуляторы пролиферации и трансформации клеток. В данном аспекте весьма привлекательны компоненты протеолитических реакций, о значении которых в регуляции жизнедеятельности клетки появляется все больше данных. Роль протеолиза в апоптозе, программированной гибели клеток, а также при некрозе уже неоднократно обстоятельно излагалась в ряде публикаций. Мы не останавливаемся на этих вопросах.

e-mail: nadulich@mail.ru

2. Получением стандартных культур клеток нервной ткани для экспериментальных исследований биологического, медико-биологического характера, включая скрининг соединений нейро- и психотропного действия, ингибиторов нейровирусных инфекций, патологии прионной этиологии и других.

3. Наметившимися в последние десятилетия тенденциями клеточной терапии в части, предусматривающей устранение дефектов нервной ткани, в том числе участков нервных стволов, а также патологически измененных клеточных элементов (они характерны, например, при рассеянном склерозе, боковом амиотрофическом склерозе, травматических повреждениях, местных нарушениях кровообращения мозга).

Биотехнология и инженерия нервной ткани теснейшим образом связаны с необходимостью детального уяснения ее гистогенеза в нормальных и патологических условиях. Это предопределяет раскрытие механизмов регуляции дифференцировки мезенхимных и нейральных стволовых клеток — проблемы, весьма далекой от полной ясности, несмотря на настойчивые попытки использования этих клеток для решения конкретных вопросов клеточной терапии.

Достаточно близко к указанной стороне проблемы примыкает расшифровка механизмов иммортализации и малигнизации клеток, а также блокирования пролиферации и стимуляции дифференцировки. В отношении нервной ткани, на наш взгляд, эти моменты стоят особенно остро, учитывая, что при локализации даже доброкачественной опухоли мозга вблизи жизненно важных центров хирургическое вмешательство весьма часто заканчивается гибелью пациента.

Решение этой кратко изложенной совокупности задач, а также раскрытие механизмов событий, про-

исходящих в нервной ткани, невозможны без участия многочисленных эндогенных регуляторных белков — факторов трофической поддержки клеток. Причем, учитывая колоссальный полиморфизм нервной ткани не только морфологического, но также функционального и метаболического характера, действие этих регуляторных белков реализуется многопланово на разные группы клеток и может изменяться в зависимости от состояния последних.

Для роста и дифференцировки клеток нервной ткани особое значение имеют, прежде всего, фактор роста нервов — NGF, продуцируемый головным мозгом фактор — BDNF, продуцируемый глией фактор — GDNF, нейротрофины: NT-3, NT-4 (13,6–28,0 кДа), фактор роста эпидермиса — EGF (6 кДа).

Другой не менее специфический для нервной ткани механизм — многочисленные звенья протеолиза. Учитывая огромное разнообразие в нервной ткани нейротрансмиттеров пептидной природы и пептидных гормонов, являющихся продуктами процессинга белков-предшественников, значение реакций протеолиза для функциональной деятельности нервной системы трудно переоценить.

Цель настоящей статьи: продемонстрировать возможности этого подхода в решении задач биотехнологии нервной ткани на примере лишь двух компонентов протеолитических реакций — плазминогена (Pg) и его сильнейшего активатора — стрептокиназы (SK).

В целом же роль протеолитических реакций и их компонентов в пролиферации и трансформации клеток, взаимодействие с белками-нейротрофинами, опираясь на данные литературы и результаты собственных исследований, можно свести к следующим основным моментам (рис. 1):

РОЛЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ



Рис. 1. Роль протеолитических реакций в регуляции пролиферации и трансформации клеток и взаимодействие звеньев протеолиза с белками-нейротрофинами.

1. Воздействия на рецепторы протеиназ, зимогенов, белков-ингибиторов протеолиза. Применительно к нервной ткани обнаружены рецепторы Pg, его тканевого активатора и подобные им [1–3]. Количество рецепторов Pg на поверхности одной клетки достигает 10^4 – 10^7 сайт/клетка и может изменяться в зависимости от ее состояния [1, 2]. Однако по данному вопросу информации в литературе очень мало. Природа специфических рецепторов также еще до конца неясна. Имеются указания, что у нейронов рецептором Pg является α -энолаза, в ряде микробных клеток – также глицераль-3-фосфатдегидрогеназа и некоторые другие белки [3, 4]. Почти 15 лет назад нами было зафиксировано образование в водно-солевом растворе довольно устойчивых эквимолярных комплексов Pg с лактат-, малатдегидрогеназами, каталазой или пируваткиназой [5, 6]. Кинетические и равновесные константы процесса формирования комплексов, согласно результатам дифференциальной спектроскопии, практически не отличались от таковых взаимодействия «стрептокиназа-Pg» – одного из самых быстрых взаимодействий белков [7]. По нашему мнению, перечисленные энзимы также могут выступать в роли рецепторов Pg. Эта возможность нуждается в обстоятельном изучении.

В аспекте анализируемой проблемы стоит также упомянуть гипотезу о значении устойчивых белковых комплексов, наделенных энзиматической активностью (в конкретном случае – РНК-азной), в имортализации клетки [8].

Далее, часть рецепторов клеток по сути могут быть пептидазами. В отношении нервной ткани таковая возможность не изучена. Вместе с тем, на клетках лимфоидного ряда было показано, что пептидазную природу имеют рецепторы CD₁₀ (нейтральная эндопептидаза 24.11), CD₁₃, CD₂₆ [9].

Наконец, в последние десятилетия были обнаружены активируемые протеиназами рецепторы (PAR) [10]. Они найдены и в нервной ткани. Принято считать, что, благодаря им, тривиальные протеиназы типа трипсина или тромбина могут играть роль местных гормонов по аутокринному, апокринному и, возможно, мерокриновому типу.

2. Протеиназы нервной ткани могут модифицировать межклеточный матрикс, в котором осуществляется ряд важных для функции клеток нервной ткани процессов. Именно в межклеточном матриксе локализуется внеклеточная часть белка-рецептора, именно в нем реализуются межклеточные и другие взаимодействия. Как правило, модификацию матрикса осуществляют матриксные коллагеназы и звено «Pg-плазмин», причем, известно, что плазмин принимает участие в активации предшественников некоторых матриксных металлопротеиназ. Это – перичеселлюлярный протеолиз. Роль данного аспекта очень объемная и выходит за рамки данного обзора.

3. Протеиназы осуществляют процессинг (пре)профакторов трофического типа. Биологически активные формы фактора роста нервов, трансформирующего фактора роста- β , инсулина образуются именно таким образом: активный NGF – при участии плазмينا и одной из металлопротеиназ [11], активный TGF- β – урокиназным активатором Pg [12]. Соответственно, и инактивация молекул регуляторных белков осуществляется (как одним из путей) в ходе протеолиза, например, расщепление инсулина протеиназой инсулизином. Конкретные участники

деструкции этих факторов и продукты их расщепления пока остаются неизученными. Компоненты протеолиза могут выступать в роли предшественников факторов регуляции пролиферации и трансформации: таков, в частности, ангиостатин – центральный фрагмент (38 кДа, содержит кринглы 1–3) молекулы Pg [13].

4. Еще одним аспектом взаимодействия регуляторных белков и протеолитических реакций является собственная протеолитическая активность регуляторных белков, которые пока не рассматриваются как протеиназы. Так, при исследовании фактора роста нервов было обнаружено, что не только γ -, но и β -субъединица обладают Pg-активаторной функцией. Кроме того, обе эти субъединицы способны расщеплять отдельные основные белки [14, 15].

Протеолитические процессы и катализирующие их протеиназы в нервной ткани чрезвычайно многообразны. Как уже упомянуто выше мы остановили свой выбор на двух компонентах протеолиза – Pg и его сильнейшем активаторе – SK. Это было обусловлено следующими моментами:

– ранее обнаружено участие в активации Pg SK-ой собственных супероксидных радикалов системы, устранение которых полностью блокирует активацию, а также выраженная супероксидконвергирующая способность SK [16–19]. Pg также способен конвергировать супероксидный радикал, однако его способность в шесть раз слабее таковой SK [20]. Продукт(ы) взаимодействия SK с супероксидным радикалом остаются неидентифицированными.

– активация Pg SK-ой специфично подавляется ATP [21], а отдельные нуклеозидфосфаты способны защищать молекулу Pg от инактивации ультрафиолетовыми лучами [22].

– установлена реализация собственного биосинтеза Pg в микроглии и отдельных группах нейронов мозга [23]. Независимо от этих работ японских авторов нами было показано появление фибринолитической активности во фракциях ядерной и «тяжелых мембран» гомогенатов головного мозга мышей при добавлении SK [24].

– на длительно незаживающих осложненных ранах был получен хороший эффект при применении состава, содержащего SK [25].

– препараты Pg и SK являются фармакопейными, они доступны и используются в клинической медицине для внутрисосудистого применения.

В силу этих обстоятельств в лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси с 1999 г. развернуты комплексные исследования действия на клетки нервной ткани, прежде всего, двух белков – Pg и SK. Результаты проведенных исследований частично обобщены в настоящей статье.

Pg – гликопротеин молекулярной массы 72–90 кДа и сложной доменной структуры. Основные свойства его молекулы обобщены в нашей статье [26]. Под влиянием активаторов он превращается в плазмин – сериновую трипсиноподобную гидролазу. SK – один из сильнейших белковых активаторов Pg, синтезируемый β -гемолитическими стрептококками ряда серологических групп. Она имеет молекулярную массу 47–55 кДа, доменную структуру, полностью лишена SH-групп и –S–S– связей [27].

Стимуляция плазминогеном и стрептокиназой регенеративной способности клеток нервной ткани, их пролиферации и дифференцировки

Чувствительные спинальные ганглии. В органной культуре спинномозговых ганглиев в стандартной питательной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), уже в первые сутки происходит разрыхление эксплантата и движение оболочечных и глиальных клеток, затем — интенсивный вырост регенерирующих отростков в радиальном направлении [28, 29]. Все эти элементы формируют зону роста. Через 6–8 сут. эксплантат уплощается и в нем (особенно по краю) просматриваются нейроны. На 9–15-е сут. в фазовом контрасте наблюдали двуконтурность нейритов, что свидетельствует об их миелинизации. При введении в такую среду Pg (10^{-9} – 10^{-7} М) в зоне роста появлялись вышедшие за пределы эксплантата нейроны, окруженные сателлитными клетками. Ее размер увеличивался достоверно от контроля при концентрации Pg 10^{-9} М уже через 24 ч, однако плотность уменьшалась. При добавке в среду Pg (10^{-7} М) + NGF через 7–10 сут. зона роста была многослойной за счет увеличения количества формирующих пучки нейритов. Воздействие Pg и NGF в питательной среде, содержащей лишь 0,5% ЭТС, приводило к аналогичным результатам на 2–3 сут. позже [29, 30].

Симпатические ганглии. На диссоциированной культуре краниально-шейных ганглиев (КШГ) новорожденных крыс показано, что добавление к инкубационной среде Pg (10^{-9} – 10^{-7} М) на 1–3-и сутки не выявило существенных морфологических изменений (размер нейронов, положение ядер и ядрышек, прозрачность цитоплазмы, длина, ветвистость нейритов и их целостность) в развитии нейробластов. Спустя 5–8 сут. при концентрации зимогена 10^{-7} М у 40% нейроцитов наблюдалось нарушение целостности отростков, а у 30% — зернистость цитоплазмы и исчезновение четкой границы между ядром и цитоплазмой [31]. При замене экзогенного NGF плазминогеном в концентрации 10^{-7} М Pg поддерживал дальнейшее развитие симпатобластов в течение 3–4 сут.: нейриты продолжали расти, начиналось их ветвление. Затем рост культур прекращался, но если они развивались на фидерном слое из ненейрональных клеток, жизнеспособность отдельных нейронов сохранялась до 30 сут. [31]. В концентрации 10^{-9} – 10^{-8} М Pg был неэффективен, клетки округлялись и гибли через 2–3 сут.

SK также существенно влияла на скорость формирования зоны роста у культивируемых чувствительных спинальных и симпатических краниальных шейных ганглиев [28, 30, 32]. На питательной среде, содержащей 10% ЭТС, влияние SK было более выражено. Зона роста культур в присутствии SK имела повышенную плотность за счет интенсивной пролиферации и миграции из эксплантата клеток различной природы. Особо выделялись многочисленные глиальные (шванновские) клетки вдоль радиально направленных нейритов, при этом миелинизация нервных волокон происходила на 7 сут. раньше, чем в контроле [30, 31]. Наблюдение за культурами до 30 сут. показало способность SK в питательной среде, содержащей 10% ЭТС, значительно улучшать их рост и развитие. Такая же картина наблюдалась после добавления SK на протяжении 7 сут. и при уменьшении концентрации ЭТС до 0,5%.

В органотипической культуре неокортекса и мозжечка новорожденных крыс через 72 ч после вве-

дения в питательную среду, содержащую 0,5% ЭТС, 10^{-7} – 10^{-8} М Pg отмечено значительное увеличение количества и длины отростков, а также усиление их арборизации. Зона роста уплотнялась в результате указанных процессов и за счет миграции из эксплантатов глиальных клеток, макрофагов и немногочисленных нейронов. Индекс пролиферации культур неокортекса и мозжечка возрастал на 49 и 57% соответственно в сравнении с контролем [29, 30, 33]. Это указывает на стимуляцию Pg-м миграции клеток в исследуемых культурах, образования этими клетками отростков.

В диссоциированной культуре неокортекса через 72 ч в питательной среде DMEM, содержащей 25% ЭТС, прикрепляемость клеток составила 80% (отростки появлялись у единичных клеток), при введении же в среду Pg (10^{-7} – 10^{-8} М) — 87% (отростки появлялись у большинства клеток) [29, 30, 33], что свидетельствует об интенсификации зимогеном регенеративных процессов.

Клетки перевиваемых линий глиомы С6, нейробластомы IMR-32, феохромоцитомы PC12. Установлено, что через 24 ч культивирования в бессывороточной среде жизнеспособность клеток глиомы С6 была на уровне 95–98%, а через 72 ч зарегистрировано ее уменьшение в 7,5 раза. Pg в концентрации 10^{-7} – 10^{-11} М обеспечивал сохранение жизнеспособности клеток на уровне контроля. При культивировании клеток нейробластомы IMR-32 продемонстрирована сходная картина [29, 30, 34, 35].

Действие зимогена на клетки глиомы С6 при всех исследуемых концентрациях вело к росту индекса пролиферации в 2,2–2,8 раз, а индекса пролиферации клеток нейробластомы IMR-32 в 1,5 раза [32, 34, 35]. Стимулирующий эффект Pg на клетки глиомы С6 и нейробластомы IMR-32 подтвержден и результатами прижизненного микроскопического исследования. Добавление Pg в бессывороточную среду культивирования способствовало формированию более плотного монослоя клеток С6 и IMR-32, а также препятствовало развитию дегенеративных изменений в клеточном пласте (рис. 2).

Добавление Pg или SK стимулировало дифференциацию клеток культуры нейробластомы IMR-32, что выражалось в образовании малигнизированных клеток клетками отростков (рис. 3).

Pg способен также снижать гибель клеток PC12, вызываемую депривацией сыворотки крови. Культивирование клеток с зимогеном на протяжении 24 ч при концентрации $\geq 10^{-7}$ М в среде, содержащей 0,5% ЭТС, снижало долю погибших клеток с 13 до 2–4%, а продолжение культивирования в течение 3–7 сут. — в 2–7 раз при концентрации Pg 10^{-8} и 10^{-11} М [29]. Кроме того, зимоген облегчал дифференцировку клеток в нейроноподобные при воздействии NGF [36, 37]. Pg или SK в отличие от NGF не вызывали трансформацию клеток феохромоцитомы по нейрональному пути, хотя зимоген и облегчал такую [30].

Изложенные результаты дают основание считать, что использованные нами белки могут существенно облегчить решение проблемы масштабной наработки клеток нервной ткани перевиваемых линий для биотехнологических целей. С другой стороны, использованные приемы также полезны в целях получения жизнеспособных органотипических культур нервной ткани для проведения экспериментальных исследований различного плана.



Контроль

Плазминоген

Стрептокиназа

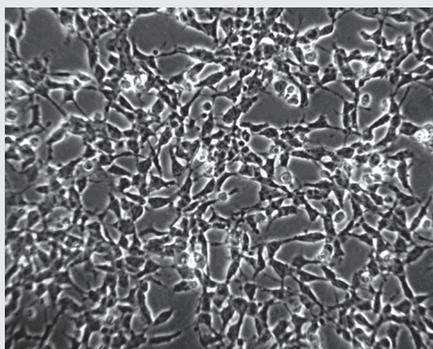
Рис. 2. Культуры клеток глиомы С6. Влияние Pg или SK (10^{-7} М) на состояние клеток через 72 ч культивирования в бессывороточной среде (контроль) [29, 30]. Фазовый контраст. Ув. $\times 100$



Контроль

Плазминоген

Стрептокиназа



Пируваткиназа

Рис. 3. Культуры клеток нейробластомы IMR-32. Влияние Pg или SK (10^{-7} М) на состояние клеток через 72 ч культивирования в бессывороточной среде (контроль) [29, 30, 35]. Фазовый контраст, масштабная линейка – 10 мкм. Ув. $\times 100$

Защитное действие плазминогена на ультраструктуру клеток нервной ткани в культуре при повреждающем действии H_2O_2 , глутамата, ионов аммония, охлаждения

На органной культуре симпатических ганглиев взрослых крыс показано, что суточная экспозиция с глутаматом (10^{-4} М) эксплантатов краниального шейного ганглия (КШГ) приводит к развитию в нейронах деструктивных изменений, протекающих как по некротическому, так и по апоптотическому типу [30, 38]. В первом случае отмечались расширение цистерн эндоплазматического ретикулума, набухание митохондрий, вакуолизация нейроплазмы и нарушение целостности наружной мембраны, во втором – неправильная форма ядер, конденсация хроматина у внутренних мембран, эктопия и исчезновение ядрышек, осмиофилия ядер и цитоплазмы с появлением отделяющих указанные структуры друг от друга перинуклеарных участков просветления, формирование патологических мембранных комплексов

митохондрий, обилие электронноплотных включений типа лизосом и др. Совместное воздействие глутамата и Pg (10^{-7} М) сопровождалось практически полным исключением некротических изменений при сохранении явлений апоптоза.

Не менее демонстративным явилось защитное действие зимогена при деструкции клеток краниального шейного ганглия, вызванной 10^{-4} М H_2O_2 [29, 30, 32], а также при депривации сыворотки в питательной среде [39, 40].

Воздействие H_2O_2 в концентрации 5×10^{-4} М в течение 20 мин нарушало однородность 6–7 сут. культур диссоциированных нейробластов КШГ новорожденных крыс. Нейробласты в стандартных условиях культивирования к этому времени достигали двукратного увеличения сомы (до 20–30 мкм в диаметре) и наблюдалась регенерация нейритов с образованием сети. Эффект гидропероксида в первые сутки выражался в уменьшении размеров около 10% нейробластов при сохранности нейритов, а спустя 2–3 сут.

происходило разрушение и отростков, и сомы примерно у 40% клеток [31]. Добавка в среду Pg (10^{-7} М, но не 10^{-9} М) оказывала протекторно-репаративный эффект, что выражалось в уменьшении доли поврежденных клеток — с 10 до 5–6% и с 40 до 20% спустя 20 мин или 2–3 сут. соответственно после указанного воздействия H_2O_2 . Деструкция отростков (нарушение непрерывности волокна, появление зернистых включений по ходу нейритов) наблюдалась реже. Иногда встречались клетки-тени. Кстати, в органотипической культуре эти ганглии также способны синтезировать активируемый Pg [31].

Экспозиция диссоциированных клеток КШГ в присутствии 0,01 М NH_4Cl в течение 24 ч вызвала значительные повреждения зоны роста и гибель 70% симпатобластов, а через трое суток — полную гибель. Инкубация таких культур в присутствии 10^{-9} М или 10^{-7} М Pg уменьшала долю погибших клеток до 30 и 20% соответственно. Действие зимогена в концентрации 10^{-7} М было сильнее — даже через 30 сут. отдельные нейроны все еще были жизнеспособны [31].

На культурах нервной ткани выявлен защитный эффект SK [30, 32, 41]. Так, он явственно проявлялся при холодовом стрессе, вызывавшем полную гибель органотипических культур спинального ганглия в среде, содержащей 0,5% ЭТС (ганглии отклеивались от подложки и всплывали), и частичную в среде, содержащей 10% ЭТС: внешний вид культур сохранялся, за исключением незначительных повреждений отдельных клеток зоны роста ганглиев. Четкое защитное действие SK на клетки симпатических ганглиев наблюдалось при повреждающем воздействии глутамата [42].

Воздействие SK на культуры клеток неокортекса новорожденных крыс также отличалось благоприятным эффектом [40, 41]. Перевод диссоциированных культур неокортекса новорожденных крыс на 14 сут. на дефицитную по белкам сыворотки (0,5% ЭТС вместо 15%) питательную среду через 48 ч вызвал статистически значимое снижение доли жизнеспособных клеток [43]. Внесение же SK сохраняло этот показатель на уровне обогащенной сывороткой питательной среды. При переводе на дефицитную среду

семисуточных культур, количество жизнеспособных клеток также снижалось, а их обработка SK вела к дальнейшему уменьшению жизнеспособности.

Как показали результаты электронной микроскопии (рис. 4) на дефицитной по белкам сыворотки крови питательной среде уже через 24 ч в астроцитах отмечены конденсация хроматина, множественные глыбки гиперхромного материала с предпочтительной локализацией у внутренней мембраны ядра. Сама мембрана расслаивалась, образуя выпячивания в сторону цитоплазмы. Цитоплазматические органеллы теряли характерную морфологию и вакуолизировались. Реактивные изменения отмечены в ядрах нейронов. В нейропиле отростки теряли правильную форму, их мембрана расслаивалась, исчезали органеллы [43]. При добавлении в такую среду Pg в клетках выявлены изменения конфигурации ядер и, в то же время, увеличение количества митохондрий, отражающее повышение регенераторных способностей клеток. Если же культивирование на дефицитной по белкам среде сочетали с добавкой SK (10^{-5} М), деструктивные изменения не проявлялись, организация эксплантата сохранялась [29, 43]. Интересной особенностью является обилие в нейронах митохондрий с умеренно плотным веществом и выраженными кристами. Через 48 ч экспозиции в такой среде астроциты в поле зрения редки. По-видимому, именно они поражаются в первую очередь. Появляются клетки, содержащие многочисленные миелиновые тельца, лизосомы и вакуоли. Возможно, это результат поглощения частиц разрушившихся клеток. В то же время, нейроны к такому воздействию более устойчивы.

Внесение ацетата аммония (0,1 М) в питательную среду с 0,5% ЭТС приводило к резкому изменению ультраструктуры клеток, в первую очередь астроцитов: к накоплению электронноплотного материала у внутренней мембраны ядра, деструктивным проявлениям в цитоплазме (ее вакуолизации, появлению миелиновых телец и исчезновению на отдельных участках плазматической мембраны), отслоению наружной ядерной мембраны и образованию ею «пузырей» разных размеров. Добавление в этом



Рис. 4.

Ультраструктурная организация эксплантата неокортекса новорожденной крысы в стандартных условиях культивирования (А, Б) и при переводе на питательную среду с дефицитом белков сыворотки крови (В, Г) [43]:

А — нейроны и глиоцит в эксплантате коры головного мозга новорожденных крыс; питательная среда DMEM + 15% ЭТС. 5 сут. *in vitro*. Ув. $\times 7200$; Б — участок аппарата Гольджи нейрона в эксплантате коры головного мозга новорожденных крыс; питательная среда DMEM + 15% ЭТС. 5 сут. Ув. $\times 36000$; В — реактивные изменения ядра нейрона на удаление трофической поддержки. 5 сут. *in vitro* + 24 ч экспозиции в питательной среде с 0,5% ЭТС. Ув. $\times 19000$; Г — изменения в астроците, вызванные переводом культуры на среду с дефицитом по белкам сыворотки. 5 сут. + 48 ч экспозиции в питательной среде с 0,5% ЭТС. Ув. $\times 10000$

случае SK или Pg предохраняло клетки от деструктивных изменений в течение всего периода исследования. Нейроны в обеих ситуациях отличались обилием митохондрий с умеренно плотным веществом и выраженными кристами (рис. 5).

Протекторное действие SK на клетки коры головного мозга выявлено также при повреждающем воздействии ионов глутамата [42].

Эти материалы позволяют считать, что использование Pg или SK при подготовке трансплантатов нервной ткани будет способствовать повышению жизнеспособности и качества трансплантируемого материала. Здесь целесообразны исследования приживляемости подготовленных подобным образом трансплантатов.

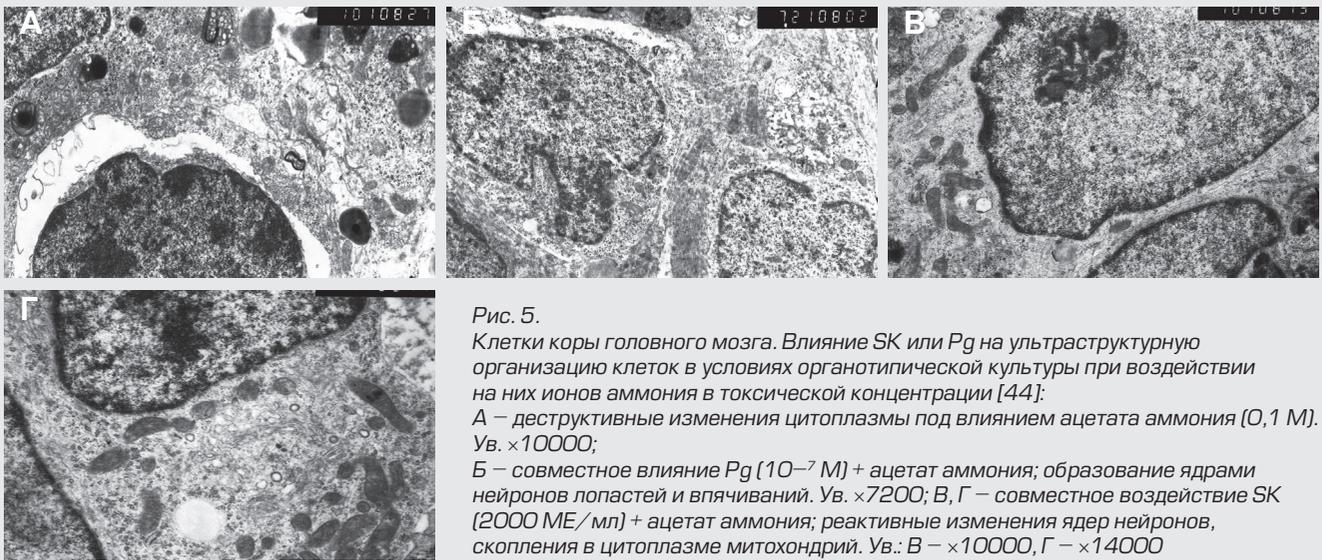


Рис. 5.

Клетки коры головного мозга. Влияние SK или Pg на ультраструктурную организацию клеток в условиях органотипической культуры при воздействии на них ионов аммония в токсической концентрации [44]:

А – деструктивные изменения цитоплазмы под влиянием ацетата аммония (0,1 М). Ув. $\times 10000$;

Б – совместное влияние Pg (10^{-7} М) + ацетат аммония; образование ядрами нейронов лопастей и впячиваний. Ув. $\times 7200$; В, Г – совместное воздействие SK (2000 МЕ/мл) + ацетат аммония; реактивные изменения ядер нейронов, скопления в цитоплазме митохондрий. Ув.: В – $\times 10000$, Г – $\times 14000$

Стрептокиназа нивелирует повреждающее действие анионной формы внеклеточной АТФ на органотипическую культуру клеток коры головного мозга крыс

АТФ (10^{-3} М) в дефицитной по белкам сыворотки крови питательной среде вызвал уменьшение доли жизнеспособных клеток (с $80,20 \pm 0,4\%$ до $77,23 \pm 0,64\%$ против $88,13 \pm 0,14\%$ в контроле) и дезорганизацию ультраструктуры нервных и глиальных клеток органотипической культуры неокортекса

новорожденных крыс (рис. 6). Внесение АТФ совместно со SK вело к увеличению доли жизнеспособных клеток до $86,53 \pm 0,97\%$, позволяло сохранить организацию клеток эксплантата, что сопоставимо с действием только одной SK и с контролем (обогащенной белками среда) (рис. 7) [44, 45]. Следовательно, SK способна полностью нивелировать деструктивный эффект АТФ на клетки нервной ткани. Более продолжительное влияние SK провоцировало развитие деструктивных изменений.

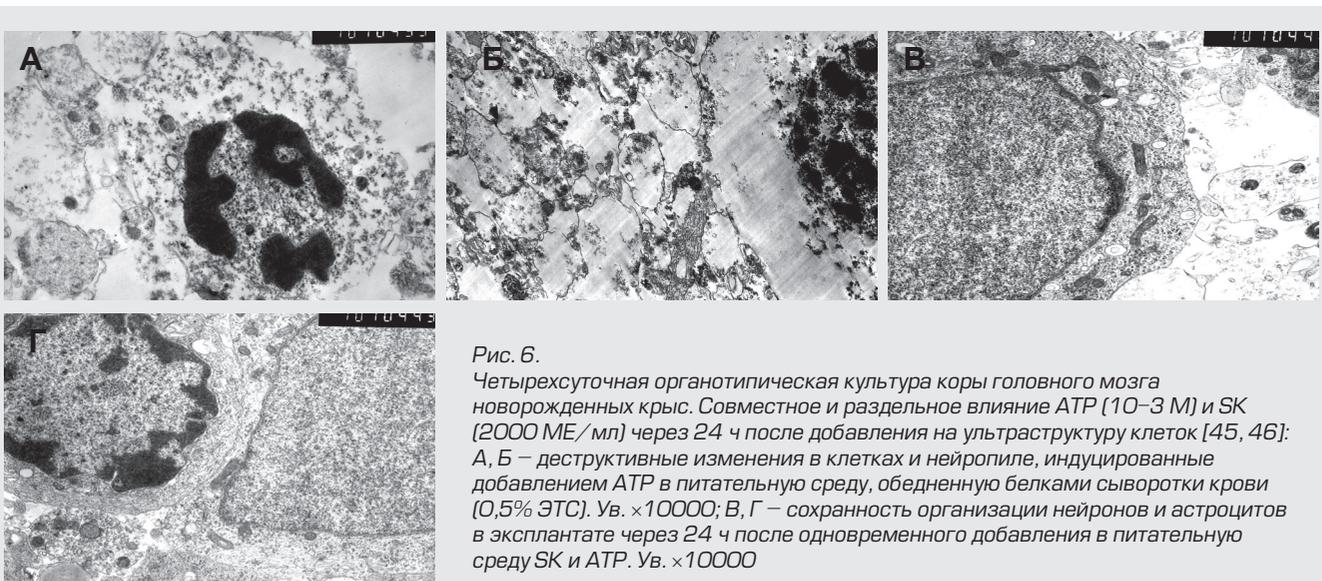


Рис. 6.

Четырехсуточная органотипическая культура коры головного мозга новорожденных крыс. Совместное и раздельное влияние АТФ (10^{-3} М) и SK (2000 МЕ/мл) через 24 ч после добавления на ультраструктуру клеток [45, 46]: А, Б – деструктивные изменения в клетках и нейропиле, индуцированные добавлением АТФ в питательную среду, обедненную белками сыворотки крови (0,5% ЭТС). Ув. $\times 10000$; В, Г – сохранность организации нейронов и астроцитов в эксплантате через 24 ч после одновременного добавления в питательную среду SK и АТФ. Ув. $\times 10000$

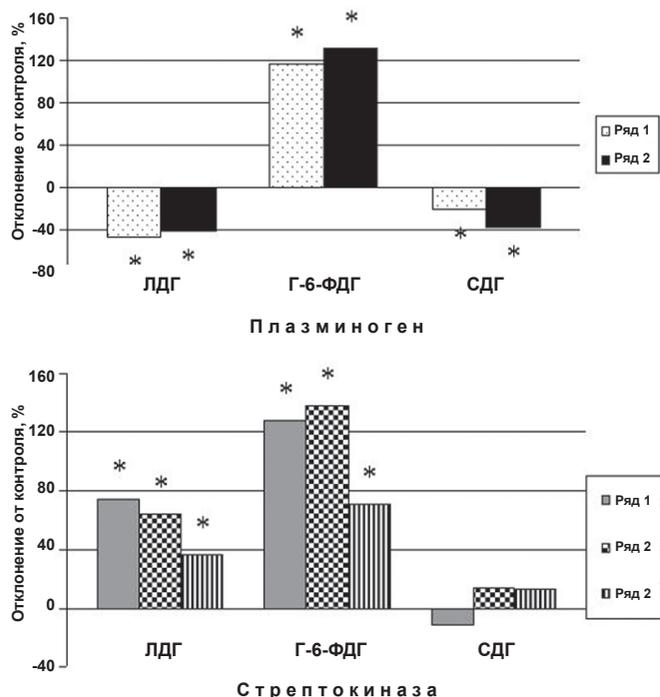


Рис. 7. Влияние Pg и SK на активность энзимов углеводно-энергетического метаболизма в диссоциированной культуре неокортекса. Концентрация Pg: 1 – 1 мкг/мл, 2 – 10 мкг/мл; концентрация SK: 1 – 2 МЕ/мл; 2 – 20 МЕ/мл; 3 – 200 МЕ/мл [47, 48] (* – здесь и далее изменения достоверные по отношению к контролю, $P \leq 0,05$)

Изменения показателей внутриклеточного метаболизма в клетках нервной ткани при воздействии плазминогена или стрептокиназы

Активность дегидрогеназ. Воздействие зимогена на клетки феохромоцитомы PC12 (10^{-11} – 10^{-6} М) в среде, содержащей 0,5% сыворотки, через 24 ч не влияло на активность лактат-, сукцинат- и NADPH-дегидрогеназ. Влияние Pg (10^{-6} М) на клетки PC12, дифференцирующиеся под воздействием NGF (100 нг/мл, 3 сут.) в нейроноподобные, через 24 ч сопровождалось снижением на 37% активности лактатдегидрогеназы и ростом активности ацетилхолинэстеразы на 25%, а в концентрации 10^{-11} – 10^{-9} М – ростом активности лактат- и NADPH-дегидрогеназ [29].

Добавление Pg в концентрации 5×10^{-8} М подавляло активность лактатдегидрогеназы в клетках глиомы С6 на 20%, не изменяя активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и вызвало тенденцию к угнетению активности сукцинатдегидрогеназы на 47,6% (см. рис. 7). Добавление SK достоверно увеличивало активность лактатдегидрогеназы на 33%, а активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – на 41,8%, что сопровождалось угнетением активности сукцинатдегидрогеназы на 35,4%. Эти результаты являются начальным этапом в изучении изменений углеводно-энергетического метаболизма в нервной ткани при действии Pg и SK.

Воздействие Pg в концентрации 10^{-9} – 10^{-7} М в течение 40 мин увеличивало в нейробластах симпатического ганглия активность сукцинатдегидрогеназы [49].

Уровень белка и нуклеиновых кислот в клетках. Эффект Pg или SK через 24 ч выражался в увели-

чении содержания РНК и белка в клетках глиомы С6 и нейробластомы IMR-32, а через 72 ч – в увеличении концентрации ДНК [29, 30, 32].

Звенья экстраклеточного протеолиза. Исследования методом лизиса фибриновых пластин выявили, что питательная среда, содержащая 10% ЭТС, не обладает собственной фибринолитической или Pg-активаторной способностью, но содержит Pg, активируемый SK-ой [29, 50].

Судя по полученным данным, зрелая культура спинальных ганглиев при переводе на дефицитную по белкам сыворотки крови среду (0,5% ЭТС) не снижала секрецию в культуральную жидкость активаторов Pg и антиплазминов. Органотипическая культура спинальных ганглиев и на среде дефицитной по белкам сыворотки крови через 5 сут. секретировала Pg в культуральную жидкость [29, 50].

Клетки PC12, выращенные на бессывороточной питательной среде, не обладали собственной фибринолитической активностью, содержали следы активируемого Pg, но обладали Pg-активаторной способностью и секретировали активаторы Pg в культуральную жидкость [29, 50]. При культивировании таких клеток на питательной среде, содержащей 0,5% ЭТС, в культуральной жидкости Pg-активаторная способность не определялась. Вместе с тем праймированные NGF клетки феохромоцитомы секретировали субстанции, активирующие Pg. Внесение в питательную среду таких клеток Pg (10^{-10} – 10^{-6} М) заметно увеличивало Pg-активаторную способность культуральной жидкости, однако это не приводило к полному исчезновению в ней активируемого Pg.

Состояние внутриклеточного протеолиза. Кратковременная (20 мин) экспозиция клеток глиомы С6 с Pg в концентрации 10^{-9} М или 10^{-7} М заметно не влияла на уровень внутриклеточного протеолиза, активируемого АТФ или ионами Ca^{2+} (5 мМ), вместе с тем, протеолиз, активируемый в присутствии 50 мкМ Ca^{2+} , подавлялся на 90 %, особенно при концентрации зимогена 10^{-9} М [29, 51].

Такая же экспозиция клеток глиомы с 0,1 МЕ/мл SK (это соответствует 5×10^{-10} М) вызвала рост уровня АТФ-активируемого протеолиза на 27%, а обеих форм Ca^{2+} -активируемого протеолиза – на 85–90% (рис. 8). При максимальной концентрации SK рост уровня всех трех форм внутриклеточного протеолиза был еще заметнее. Кстати, эффект SK в такой достаточно высокой концентрации свидетельствует дополнительно в пользу действия именно SK, а не активированного ею Pg с образованием плазмина. Хорошо известно, что избыток SK не только осложняет активацию Pg, но и, образуя комплексы с плазмином, резко подавляет его протеолитическую активность.

20-минутная экспозиция клеток PC12 с Pg сопровождалась снижением интенсивности АТФ-активируемого протеолиза на 27–50% в зависимости от концентрации зимогена. Концентрационная зависимость эффекта имела сложный характер [53]. Уровень протеолиза, активируемого низкими концентрациями Ca^{2+} (50 мкМ), при добавке зимогена в диапазоне концентраций 10^{-10} – 10^{-7} М подавлялся в 3,3–5 раз, а при его концентрации 10^{-6} М этот протеолиз стимулировался в 1,4 раза. Активируемый 5 мМ Ca^{2+} протеолиз при концентрации зимогена 10^{-10} М возрастал в 1,8 раза, а при концентрации 10^{-9} – 10^{-7} М – снижался в 2,5–3,3 раза [53].

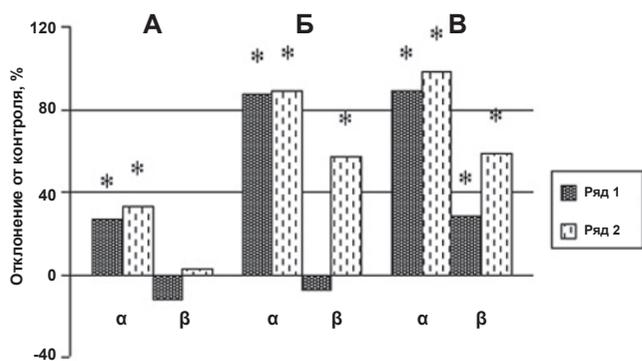


Рис. 8. Влияние добавления в питательную среду стрептокиназы в концентрации 0,1 (1) или 2000 (2) МЕ/мл на уровень АТФ-активируемого (А) или 1-Са²⁺-активируемого (Б) и 2-Са²⁺-активируемого (В) протеолиза в клетках глиомы С6. Экспозиция 20 мин (α) или 24 ч (β) [52]

Добавление SK к культуре феохромоцитомы PC12 вело к угнетению АТФ-активируемого протеолиза. Оно было более сильным, чем при действии P_g [54]. Добавление SK вызвало сильное подавление 1-кальпаиновой активности вплоть до полного ее отсутствия. Практически мы не наблюдали повышения уровня этого типа протеолиза.

Секреция интерлейкина-6 клетками глиомы С6. Внесение P_g в среду контрольных клеточных культур вызвало достоверное увеличение на 30% секреции цитокина [55, 56].

На наш взгляд, наглядно подтверждают стимулирующее метаболизм клеток влияние P_g эксперименты по воздействию зимогена совместно с глицином на клетки глиомы С6 (рис. 9). В концентрации 0,01 мМ глицин вызвал заметную пролиферацию клеток. Это само по себе примечательно, поскольку принято считать, что успешная реализация биосинтеза белка в клетках (без чего пролиферация невозможна) требует одновременно все 20 аминокислот. Однако в присутствии дополнительно P_g наблюдалось резкое усиление пролиферации, значительно превысившее ожидаемый суммарный эффект. Кстати, эти материалы свидетельствуют и о том, что различные соединения биогенной или ксеногенной природы могут заметно влиять на характер нейротрофического действия P_g и SK. Здесь открываются широкие перспективы дальнейших исследований.

Следовательно, полученные факты подтверждают стимулирующее жизнеспособность клеток нервной ткани воздействие P_g и SK, а также изменения метаболизма клеток, что может оказаться весьма полезным при направленном получении целевых продуктов жизнедеятельности нейро- и глиоцитов.

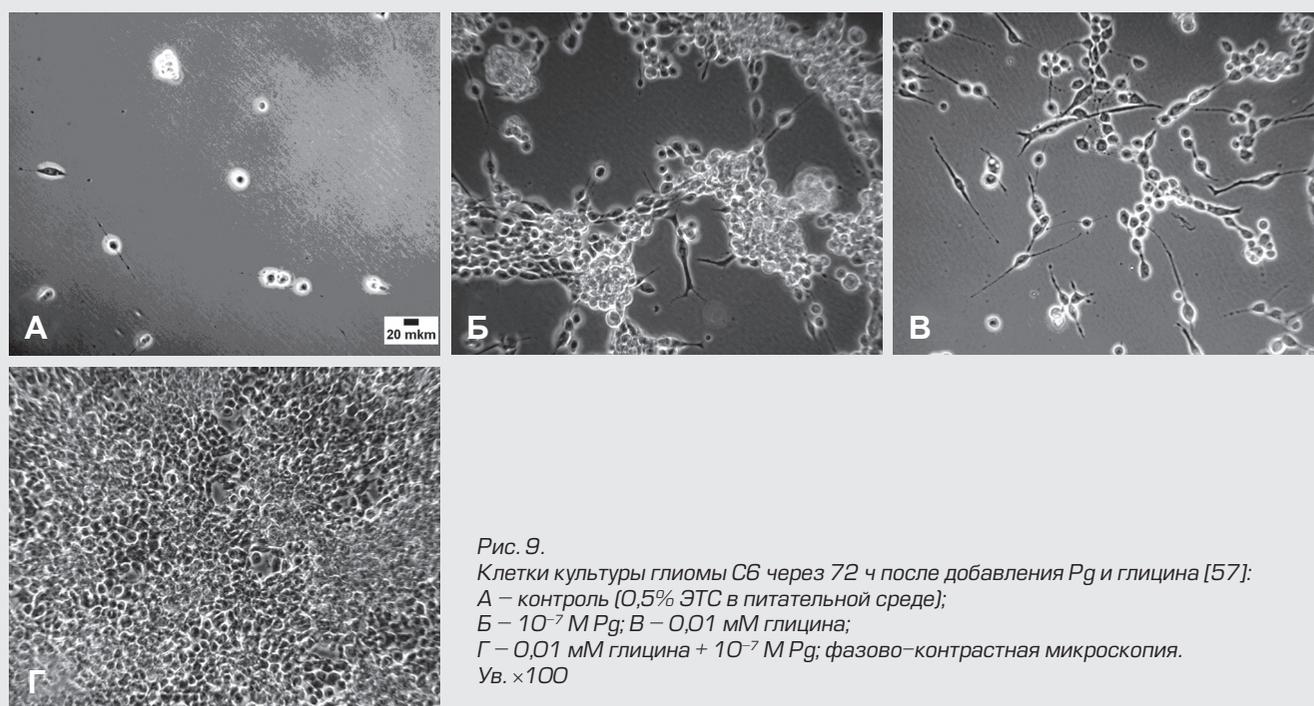


Рис. 9. Клетки культуры глиомы С6 через 72 ч после добавления P_g и глицина [57]: А – контроль (0,5% ЭТС в питательной среде); Б – 10⁻⁷ М P_g; В – 0,01 мМ глицина; Г – 0,01 мМ глицина + 10⁻⁷ М P_g; фазово-контрастная микроскопия. Ув. ×100

Интеграция плазминогена или стрептокиназы в эквимольные комплексы с пируваткиназой снимает цитотоксический эффект пируваткиназы на клетки глиомы С6

Учитывая выявленное нами образование устойчивых эквимольных комплексов P_g или SK с энзимом углеводно-энергетического метаболизма [5, 6], в частности, с пируваткиназой (ПК), было изучено действие и этого белка, а также устойчивых эквимольных комплексов ПК с P_g или SK [29, 35, 58, 59] В целом, эти материалы раскрывают самостоятель-

ную проблему. Так, были обнаружены стимуляция роста и дифференцировки клеток нейробластомы IMR-32 (см. рис. 3) и разрушение клеток глиомы С6 при добавлении РК. Интеграция же белков в подобные комплексы способствовала, в частности, заметному снижению цитотоксического действия РК на клетки глиомы С6.

Данное обстоятельство, на наш взгляд, может иметь специфическое значение. В настоящее время неясно, как конкретно в каждом случае изменение условий культивирования отражается на экс-

прессии собственных белков клеток нервной ткани. По-видимому, усиление синтеза их может иметь и отрицательные последствия для клетки. В этом плане описанный эффект имеет прикладное значение, поскольку таковой вопрос впервые ставится.

Возможность регуляции стрептокиназой или плазминогеном водно-электролитного баланса в клетках нервной ткани

Внесение в питательную среду DMEM, содержащую 0,5% ЭТС, NaCl до конечной концентрации 2% через 24 ч вызвало изменения в состоянии клеток перевиваемых культур глиомы С6. Если в обычной культуре, даже при дефиците белков сыворотки в течение 24 ч клетки оставались распластанными, с тремя и более отростками, в гипертонической среде они теряли спо-

собность к адгезии, становились «приподнятыми и сжатыми», выпуклыми и вытянутыми, теряли часть отростков, изменяли присущую им мультиполярную форму и часто приобретали веретенообразную биполярную. В хорошо развитой монослойной культуре появлялись свободные от клеток и их отростков пространства (рис. 10). Оставшиеся отростки утончены (по сравнению с контролем). При внесении в питательную среду одновременно с хлористым натрием SK через 24 ч монослой культуры сохранял первоначальную архитектуру, клетки имели типичную морфологию самих тел и их отростков. Следовательно, SK способна влиять на процесс дегидратации в гипертонической среде, препятствуя выходу жидкости из клетки. Такую же картину наблюдали и в экспериментах с культурами нейробластомы IMR-32 [60].

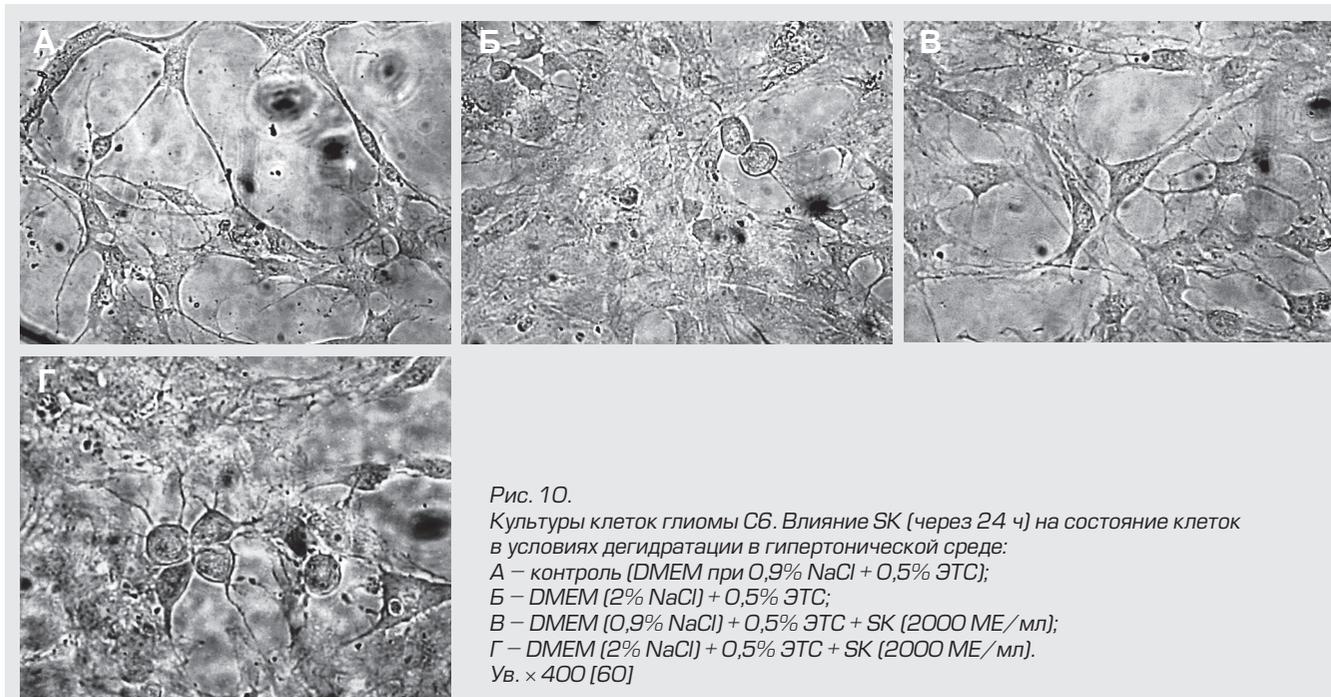


Рис. 10. Культуры клеток глиомы С6. Влияние SK (через 24 ч) на состояние клеток в условиях дегидратации в гипертонической среде:
 А – контроль (DMEM при 0,9% NaCl + 0,5% ЭТС);
 Б – DMEM (2% NaCl) + 0,5% ЭТС;
 В – DMEM (0,9% NaCl) + 0,5% ЭТС + SK (2000 ME/мл);
 Г – DMEM (2% NaCl) + 0,5% ЭТС + SK (2000 ME/мл).
 Ув. × 400 [60]

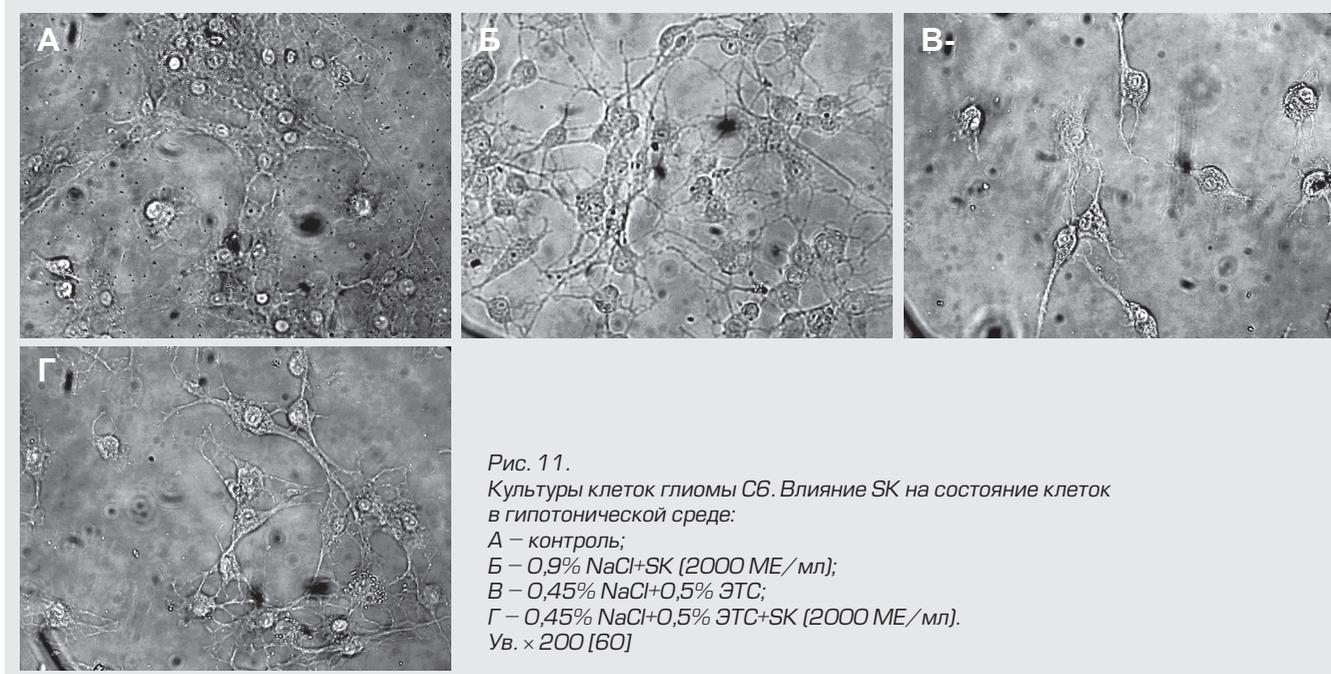


Рис. 11. Культуры клеток глиомы С6. Влияние SK на состояние клеток в гипотонической среде:
 А – контроль;
 Б – 0,9% NaCl+SK (2000 ME/мл);
 В – 0,45% NaCl+0,5% ЭТС;
 Г – 0,45% NaCl+0,5% ЭТС+SK (2000 ME/мл).
 Ув. × 200 [60]

Экспозиция клеток исследуемых линий в гипотонической среде (концентрация NaCl — 0,45%) вела к набуханию клеток, укорочению или полной потере отростков, и, как следствие, дезинтеграции межклеточных контактов (рис. 11). Количество клеток уменьшалось. При внесении в питательную среду в условиях гипотонической среды SK клетки обеих культур выглядели удовлетворительно, практически все клетки имеют более чем два отростка, образующих контакты — признаки успешного развития клеток, их жизнеспособности. Следовательно, SK способна также препятствовать «притоку» избытка воды в клетки.

Проблема направленной регуляции образования специфических для нервных клеток целевых продуктов в биотехнологии пока далека от решения. Введение клеток в состояние гипо- или гипертонической среды может само по себе существенно изменить это образование. Однако при этом важно сохранять жизнеспособность и структурную целостность клеток, что, как видно из представленного в данном разделе материала, вполне достижимо.

Заключение

Итак, полученные на разнообразных культурах клеток нервной ткани результаты раскрывают следующие ранее не описанные в литературе до наших работ аспекты:

- стрептокиназа и плазминоген оказывают прямое, неопосредованное через кровоток воздействие на жизнеспособность нейронов и глиоцитов, стимулируя пролиферацию а, в ряде моментов — дифференцировку в условиях отсутствия иных нейротрофических белковых факторов;

- плазминоген и стрептокиназа в концентрациях $\leq 10^{-9}$ М даже при непродолжительном воздействии вызывают существенные изменения метаболизма клеток нервной ткани;

- плазминоген и стрептокиназа защищают клетки нервной ткани при повреждающем воздействии гидропероксида, глутамата, анионов АТФ, ионов аммония, охлаждения, дегидратации и гипергидратации клеток нервной ткани;

- плазминоген и стрептокиназа при интеграции их в комплексы с пируваткиназой снимают цитотоксическое действие последней на клетки глиомы.

Изложенная совокупность основных результатов четко демонстрирует нейротрофические свойства белков [61–64], не только выдвигает ряд проблем фундаментального плана, но и создает основу для разработки конкретных подходов в биотехнологии, нейрофармакологии и патоневрологии.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Miles L.A., Levin E.G., Plescia J. et al. Plasminogen receptors, urokinase receptors and their modulation on human endothelial cells. *Blood* 1988; 72(2): 628–35.
2. Burtin P., Fondaneche M.-C. Receptor for plasmin on human carcinoma cells. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1988; 80(10): 762–5.
3. Kohsaka S. Plasminogen binds specifically to α -enolase on rat neuronal plasma membrane. *J. Neurochem.* 1994; 63: 2048–57.
4. Kolberg J., Aase A., Bergmann S. et al. Streptococcus pneumoniae enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. *Microbiol.* 2006; 152: 1307–17.
5. Никандров В.Н., Воробьева Г.В., Мурашко О.Н. и др. Взаимодействие стрептокиназы и плазминогена человека с оксидоредуктазами и пируваткиназой: формирование устойчивых комплексов в водно-солевом растворе. Докл. АН Беларуси. 1997; 41(3): 69–75.

В рассматриваемом ракурсе значимым является впервые установленное эффекторное действие стрептокиназы на жизнедеятельность клеток нервной ткани, реализующееся часто в концентрации наномолярного порядка. Это позволяет принципиально иначе оценивать возможности использования стрептокиназы и плазминогена, учитывая наличие фармацевтических препаратов данных белков. В этом плане вырисовывается широкий фронт исследований по проработке на лабораторных животных в моделях патологических состояний путей и схем лечебного применения препаратов этих белков.

Еще одной важной сферой применения описанных феноменов являются биотехнологии. Они подразумевают, прежде всего, возможность культивирования разнообразных клеток нервной ткани на практически не содержащих сыворотки крови питательных средах, что имеет исключительно важное значение при биохимической очистке нейроспецифических белков, поскольку позволяет исключить присутствие балластных белков сыворотки крови. Следует отметить, что получение рекомбинантных белков не всегда бывает экономически выгодным. В этом плане нами предложены оригинальные способы культивирования клеток нервной ткани, изложенные в патентах [33, 65–67]. Еще одно приложение в медицинских биотехнологиях — трансплантация нервной ткани, где для трофической поддержки трансплантируемого материала могут быть применены разработанные способы культивирования.

Более того, до сих пор в литературе обсуждается вопрос о возможности пролиферации нейронов в уже созревшей нервной ткани. Результаты последних экспериментов дают нам основания считать возможной стимуляцию их пролиферации. Так, на органо-типической культуре спинного мозга было выявлено увеличение количества клеток, морфологически отличающихся от астроцитов и при окрашивании по Нислю характеризующихся присутствием обильной тигроидной субстанции [68, 69]. Разумеется, для окончательного вывода требуется проведение дополнительных тестов для идентификации нейронов. Однако из литературы неизвестны другие клетки нервной ткани, имеющие тигроидную субстанцию.

Известно, что клетки нервной ткани дифференцируются из предшествующих стволовых соответствующего типа. Однако регуляция такой дифференцировки далека от ясности. Полученные нами результаты четко свидетельствуют о чрезвычайно важной проблеме раскрытия роли в этом процессе звена плазминоген-плазмин и возможности использования стрептокиназы в качестве эффектора.

6. Nikandrov V.N., Murashko O.N., Vorobyova G.V. et al. Integration of human plasminogen or streptokinase into stable complexes with oxidoreductases and pyruvate kinase. *Lett. Pept. Sci.* 1997; 4(4-6): 497–02.
7. Никандров В.Н., Мурашко О.Н., Воробьева Г.В. и др. Кинетика взаимодействия «стрептокиназа-плазминоген», а также стрептокиназы или плазминогена с ферментами углеводно-энергетического метаболизма. Проблемы медицинской энзимологии: Тр. Всерос. конф. М.; 2002. с. 165.
8. Хмара М.Е., Никандров В.Н. Образование термостабильных энзиматически активных комплексов как новый аспект регуляции пролиферации клетки. Докл. НАН Беларуси. 1999; 43(2): 68–1.
9. Kenny A.J., O'Hare M.J., Gusterson B.A. Cell-surface peptidases as modulators of growth and differentiation. *Lancet* 1989; 2: 785–7.
10. Böhm S.K., McConalogue K., Kong W. Et al. Proteinase activated receptors: new function of old enzymes. *News Physiol. Sci.* 1998; 13: 222–40.

11. Lee R., Kermani P., Teng K.K. et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001; 294(5548): 1945–8.
12. Binder B.R., Christ G., Gruber F. et al. Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol. Sci.* 2002; 17: 56–61.
13. Moser T.L., Stack M.S., Asplin I. et al. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *PNAS USA.* 1999; 96: 2811–6.
14. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Энзиматические свойства фактора роста нервов и его субъединиц. *Проблемы медицинской энзимологии: Труды Всерос. конф. М.; 2002. с. 163–4.*
15. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Институт физиологии НАН Беларуси. Способ определения протеолитической активности γ - или β -субъединицы фактора роста нервов. Патент ВУ № 11953. 30.06.2009.
16. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Вотяков В.И. и др. Обнаружение супероксиддисмутазной активности у стрептокиназы. *Докл. АН БССР.* 1986; 30(11): 1033–6.
17. Nikandrov V.N. On the plasminogen-activating function of streptokinase. *Intern. J. Biochem.* 1992; 24(1): 47–53.
18. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Кислородзависимый путь активации плазминогена и новые физико-химические механизмы протеолиза. *Известия НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук.* 2001; (1): 54–60.
19. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Some unusual manifestation of proteolysis. *Cel. Mol. Biol.* 2006; 52(4): 30–9.
20. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Регуляторные белки: функциональные свойства молекул и механизмы их биологического действия. *Известия НАН Беларуси. Серия мед.-биол. наук.* 2003; 3: 75–89.
21. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Вотяков В.И. Влияние адениловых нуклеотидов на активаторную функцию стрептокиназы. *Бюлл. экспер. биол. мед.* 1987; 104(7): 49–51.
22. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. Протекторное действие пуриновых нуклеотидов на плазминоген человека. *Функциональная роль монооксида азота и пуринов. Сб. статей. Минск; 2001. с. 142–6.*
23. Kohsaka S., Hamanoue M., Nakajima K. Functional implication of secretory proteases derived from microglia in the central nervous system. *Keio J. Med.* 1996; 45(3): 265–9.
24. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. Значение окислительно-восстановительных реакций в активации плазминогена субклеточными фракциями головного мозга и печени. *Докл. НАН Беларуси.* 1998; 42(4): 94–9.
25. Никандров В.Н., Белоенко Е.Д., Казюич О.А. и др. Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии. Мазь для лечения длительно незаживающих ран. Патент РФ № 2027472. 27.01.1995.
26. Никандров В.Н. Структура и свойства молекулы плазминогена. *Новости мед.-биол. наук.* 2004; 3: 127–46.
27. Никандров В.Н. Структурная организация молекулы стрептокиназы. *Биоорг. химия.* 1994; 20(2): 169–81.
28. Никандров В.Н., Петрусенко Г.П., Жук О.Н. и др. Действие компонентов перичеллюлярного протеолиза на клетки нервной ткани. *Достижения медицинской науки Беларуси, вып. VII. Рецензир. научно-практ. ежегодник; Минск: 2002. с. 49–50.*
29. Никандров В.Н., Жук О.Н., Пыжова Н.С. и др. Значение плазминогена как фактора трофического характера для культур клеток нервной ткани. *Известия НАН Беларуси. Сер. мед. наук.* 2008; 1: 85–97.
30. Никандров В.Н., Жук О.Н., Гронская Р.И. и др. Проблемы биотехнологии клеток нервной ткани: исследования белковых факторов трофического характера. *Материалы, методы и технологии. Научные статьи 2007. Бургас, Болгария; 2007. с. 48–66.*
31. Никандров В.Н., Жук О.Н., Полукошко Е.Ф. и др. Молекулярные основы функционирования вегетативных ганглиев: влияние компонентов перичеллюлярного протеолиза на структурно-функциональные характеристики клеток. *Нейрогуморальные механизмы регуляции функций в норме и патологии. Минск, 2007. с. 156–61.*
32. Никандров В.Н., Жук О.Н., Полукошко Е.Ф. и др. Действие плазминогена и стрептокиназы на жизнедеятельность клеток нервной ткани в культуре. *Биомед. химия.* 2008; 54(2): 192–200.
33. Жук О.Н., Никандров В.Н. Институт физиологии НАН Беларуси. Способ культивирования нервной ткани и нервных клеток млекопитающих. Патент ВУ № 8301. 04.04.2006.
34. Романовская А.А., Никандров В.Н. Плазминоген и стрептокиназа в регуляции пролиферации клеток глиомы С6 и нейробластомы IMR-32. *Докл. НАН Беларуси.* 2007; 51(2): 57–60.
35. Romanovskaya A.A., Nikandrov V.N. Effects of plasminogen, streptokinase and their equimolar complexes with pyruvate kinase on the human neuroblastoma IMR-32 cells. *Cell Tiss. Biol.* 2007; 1(5): 412–9.
36. Гронская Р.И., Шпак Г.А., Никандров В.Н. Плазминоген способствует нейрональному преобразованию клеток РС12. *IV съезд физиологов Сибири. Тез. докл. Новосибирск; 2002. с. 65.*
37. Шпак Г.А., Никандров В.Н. Экзогенный плазминоген участвует в морфогенезе клеток РС12. *II Российский симпозиум по химии и биологии пептидов. Тез. докл. и стенд. сообщений. Санкт-Петербург; 2005. с. 137.*
38. Жук О.Н., Калюнов В.Н., Никандров В.Н. Электронномикроскопический анализ взаимодействия глутамата, плазминогена и фактора роста нервов на уровне симпатических нейронов. *Колосовские чтения-2002. IV Междунар. конф. по функциональной нейроморфологии. Тез. докл. Санкт-Петербург; 2002. с. 110.*
39. Полукошко Е.Ф., Никандров В.Н. Протекторное действие плазминогена на культуры диссоциированных симпатобластов краниального шейного ганглия новорожденной крысы. *Колосовские чтения-2002. IV Междунар. конф. по функциональной нейроморфологии. Тез. докл. Санкт-Петербург; 2002. с. 230.*
40. Жук О.Н., Полукошко Е.Ф., Никандров В.Н. Изменение состояния клеток нервной ткани в культуре при воздействии плазминогена и стрептокиназы. *Механизмы функционирования висцеральных систем. III Всерос. конф. Тез. докл. Санкт-Петербург; 2003. с. 106–7.*
41. Жук О.Н., Полукошко Е.Ф., Никандров В.Н. Влияние стрептокиназы на жизнеспособность, развитие и структурно-функциональную организацию клеток коры головного мозга и некоторых периферических ганглиев новорожденных крыс в культуре ткани. *Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине. Матер. междунар. конф. Минск; 2004. с. 133–4.*
42. Никандров В.Н., Жук О.Н., Полукошко Е.Ф. и др. Структурно-функциональное состояние клеток краниально-шейного ганглия и неокортекса крысы при воздействии стрептокиназы на фоне повреждающего эффекта глутамата. *Механизмы функционирования висцеральных систем. VII Всерос. конф. с междунар. участием посвящ. 160-летию со дня рождения И.П. Павлова. Тез. докл. Санкт-Петербург; 2009. с. 309–10.*
43. Никандров В.Н., Жук О.Н. Влияние стрептокиназы на развитие клеток коры головного мозга *in vitro*. *Морфология* 2005; 128(5): 33–6.
44. Жук О.Н., Никандров В.Н., Вашкевич Е.И. Защитное действие плазминогена и стрептокиназы на клетки неокортекса при повреждающем действии ионов аммония. *Физиол. ж. Матер. XVIII съезда Украинского физиол. об-ва с междунар. участием. 2010; 56(2): 8.*
45. Никандров В.Н., Жук О.Н. Влияние стрептокиназы на деградацию культивируемых клеток коры головного мозга крыс, вызванную действием АТФ. *Нейронауки: теорет. и клин. аспекты. 2005; 1(1): прил 1: 84–5.*
46. Никандров В.Н., Жук О.Н. Влияние стрептокиназы на структуру клеток нервной ткани. *Взаимодействие с АТФ. XI съезд Белорус. об-ва физиологов. Тез. докл. Минск; 2006. с. 102–3.*
47. Никандров В.Н., Лукашевич В.С., Гронская Р.И. Модуляция углеводно-энергетического метаболизма клеток нервной ткани при воздействии плазминогена и стрептокиназы. *Актуальные теоретические и прикладные аспекты патофизиологии. Матер. республ. конф. с междунар. участием. Гродно; 2010. с. 165–9.*
48. Никандров В.Н., Лукашевич В.С., Гронская Р.И. Влияние плазминогена и стрептокиназы на звенья углеводно-энергетического обмена клеток глиомы С6. *Физиол. ж. Матер. XVIII съезда Украинского физиол. об-ва с междунар. участием. 2010; 56(2): 18–9.*
49. Гронская Р.И., Полукошко Е.Ф., Шпак Г.А. и др. Влияние плазминогена на рост и развитие культур клеток феохромоцитомы РС12 и симпатобластов краниального шейного ганглия крыс. *Функциональная нейроморфология. Фундаментальные и прикладные аспекты. К 100-летию академика Д.М. Голуба: Минск; 2001. с. 77–9.*
50. Полукошко Е.Ф., Пыжова Н.С., Гронская Р.И. и др. Состояние звеньев системы «плазминоген-плазмин» в культуре ткани спинномозговых ганглиев новорожденной крысы и в праймированных фактором роста нервов клетках РС 12. *Междунар. конф. «Протеолиз, механизмы его регуляции и роль в физиологии и патологии клетки». Тез. докл. Минск; 2007. с. 60–1.*
51. Балашевич Т.В., Гронская Р.И., Тумилович М.К. и др. Влияние плазминогена и глицина на уровень АТФ- и Ca^{2+} -активируемого протеолиза в клетках глиомы С6. *IV Российский симпозиум. «Белки и пептиды». Тез. докл. Казань; 2009. с. 370.*
52. Никандров В.Н., Тумилович М.К. Влияние стрептокиназы на уровень АТФ- и Ca^{2+} -активируемого протеолиза в клетках глиомы С6 на фоне воздействия ионов аммония или глутамата. *Механизмы функционирования висцеральных систем. VII Всерос. конф. с междунар. участием посвящ. 160-летию со дня рождения И.П. Павлова. Тез. докл. Санкт-Петербург; 2009. с. 311–2.*
53. Никандров В.Н., Петрусенко Г.П., Гронская Р.И. и др. Изменение активности АТФ- и Ca^{2+} -зависимого протеолиза в клетках феохромоцитомы РС12, вызванные воздействием плазминогена и фактора роста нервов. *Известия НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук.* 2003; (2): 54–8.
54. Никандров В.Н., Петрусенко Г.П., Гронская Р.И. Состояние АТФ- и Ca^{2+} -зависимого протеолиза в клетках феохромоцитомы РС12 при действии стрептокиназы и фактора роста нервов. *Известия НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук.* 2003; (4): 84–7.
55. Лукашевич В.С., Гронская Р.И., Никандров В.Н. Плазминоген усиливает секрецию интерлейкина-6 клетками глиомы. *Механизмы функционирования висцеральных систем. VII Всерос. конф. с междунар. участием посвящ. 160-летию со дня рождения И.П. Павлова. Тез. докл. Санкт-Петербург; 2009. с. 252–3.*

56. Лукашевич В.С., Гронская Р.И., Никандров В.Н. Влияние плазминогена на секрецию интерлейкина-6 клетками глиомы С6 на фоне действия гидропероксида и хлорида аммония. *Новости мед.-биол. наук.* 2009; (3): 66–9.

57. Балашевич Т.В., Никандров В.Н. Особенности состояния клеток глиомы С6 в культуре при совместном воздействии плазминогена и глицина. *Известия НАН Беларуси. Сер. мед. наук.* 2010; (3): 38–1.

58. Романовская А.А., Никандров В.Н. Влияние стрептокиназы и ее эквимольных комплексов с пируваткиназой на клетки глиомы С6. *Известия НАН Беларуси. Сер. мед. наук.* 2007; (1): 69–74.

59. Романовская А.А., Никандров В.Н. Морфо-функциональное состояние клеток глиомы С6 под влиянием эквимольных комплексов плазминогена с пируваткиназой. *Известия НАН Беларуси. Сер. мед. наук.* 2008; 3: 28–3.

60. Жук О.Н., Никандров В.Н., Полукошко Е.Ф. и др. Особенности действия стрептокиназы и фактора роста нервов при дегидратации клеток глиомы С6 и нейроblastомы IMR-32. Проблемы регуляции висцеральных функций. Сб. научн. статей. Книга 1. Минск; 2008. с. 32–6.

61. Никандров В.Н. Перичеллюлярный протеолиз в жизнедеятельности нервных клеток: влияние плазминогена и стрептокиназы на культуры нервной ткани. Научные труды I съезда физиологов СНГ. Том 2. М.; 2005. с. 48.

62. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Петрусенко Г.П. и др. Нейротропное действие плазминогена и стрептокиназы: исследования на культурах клеток нервной ткани. Механизмы функционирования висцеральных систем. IV Всеросс. конф. Тез. докл. Санкт-Петербург; 2005. с. 174–5.

63. Никандров В.Н. Трофический эффект компонентов протеолиза в обеспечении пролиферации и трансформации клеток. Состояние и перспективы трансплантологии. Матер. Междунар. научно-практ. конф. Минск; 2008. с. 46–51.

64. Nikandrov V.N., Zhuk O.N., Polukoshko E.F. et al. Plasminogen and streptokinase protect nervous tissue cells from damaging effect of ammonia ions or glutamate. 1st Conference of the European Research Institute for Integrated Cellular Pathology. Integrated cellular pathology: death, danger and degradation. Abstract book. Paris; 2010. p. 72.

65. Гронская Р.И., Никандров В.Н. Институт физиологии НАН Беларуси. Способ культивирования перевиваемой линии клеток млекопитающих. Патент BY № 8876. 24.10.2006.

66. Лукашевич В.С., Лукашевич И.Б., Никандров В.Н. Институт физиологии НАН Беларуси. Способ культивирования перевиваемой линии клеток млекопитающих. Патент BY № 8877. 24.10.2006.

67. Романовская А.А., Никандров В.Н., Гронская Р.И. Институт физиологии НАН Беларуси. Способ культивирования перевиваемой линии нейроblastомы IMR-32. Патент BY № 12585. 08.06.2009.

68. Балашевич Т.В., Никандров В.Н. О влиянии глицина на состояние нейронов и глиоцитов культуры спинного мозга крысы. Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды. VII Всеросс. конф. с международным участием. Санкт-Петербург; 2010. с. 24.

69. Балашевич Т.В., Никандров В.Н. Институт физиологии НАН Беларуси. Способ стимуляции пролиферации культивируемых нейронов спинного мозга млекопитающих. Заявка на патент № а20100848 с приоритетом от 31.05.2010.

Поступила 2.08.2010

Система для проведения экстракорпорального фотофереза – UVAR XTS («Therakos», США)

Экстракорпоральный фотоферез представляет собой метод, основанный на сочетании лейкофереза и облучения лейкоцитов, предварительно обработанных фотосенсибилизатором (8-метоксисораленом), ультрафиолетовым светом диапазона А (320 – 400 нм).

Область применения:

Лечение онкологических, аутоиммунных, дерматологических и пролиферативных заболеваний:

- Т-клеточная злокачественная лимфома кожи,
- атопический дерматит,
- склеродермия,
- псориаз,
- ревматоидный артрит,
- отторжение органов после
- уменьшение реакции трансплантат против хозяина (РТПХ).

Особенности системы:

- **Безопасность для пациента:**
- одноразовая система расходных материалов,
- исключение риска воздушной эмболии,
- исключение риска заражения,
- осуществление контроля поступления антикоагулянта,
- контроль давления в системе,
- контроль скорости забора и возвращения крови пациенту,
- возможность изменения параметров процесса в течение процедуры,
- при необходимости автоматическая блокировка системы магистралей.

Простота в работе и обслуживании:

- удобное использование для оператора,
- конструкция аппарата и расходных материалов исключают возможность ошибки при загрузке,
- однократная вентуляция,
- полная автоматизация процедуры,
- быстрое и безопасное извлечение компонентов процедурного набора после завершения процедуры,
- наличие ключа данных, на котором фиксируется вся информация о протекании процесса.



Система для выделения стволовых клеток – Sepax («BioSafe», Швейцария)

- Самая современная, компактная система, позволяющая выделять стволовые клетки из пуповинной и периферической крови, а также из костного мозга.
- Идеальная система для быстрой автоматической обработки крови с высоким уровнем жизнеспособности клеток после процедуры.
- Sepax позволяет проводить обработку крови в рамках 8 протоколов.
- Принцип действия Sepax основан на сепарации центрифугированием, позволяющем разделять компоненты крови в соответствии с их плотностью и размерами.
- Система предназначена для применения в клеточной терапии, где необходимо получение определенных компонентов крови.
- Обработка крови или ее компонентов происходит в закрытой стерильной системе.
- Компоненты крови собираются в стандартные мешки и готовы для дальнейшего использования (криоконсервация, наращивание in vitro, переливание пациенту и др.).

Эксклюзивный представитель ООО «Инновационные Медицинские Технологии»

Москва, ул. Ивана Франко, д. 4, корп. 15, тел/факс: +7(495)380-36-62

E-mail:

dr_fedorov@haemoline.ru , gerasimenkody@haemoline.ru, neunylomamv@delrus.org



Therakos
Innovative Cell Therapy

Автоматизированная система для хранения стволовых клеток в жидком азоте – BioArchive («Thermogenesis», США).

Система рассчитана на 3626 образцов стволовых клеток

- Низкая стоимость операционного процесса
- Низкий расход жидкого азота на один образец во время хранения и программного замораживания
- Полностью автоматизированный процесс сокращает время работы персонала
- Снижение затрат на оборудование
- Не требуется большого количества дьюаров для хранения (одна система BioArchive заменяет 6-7 дьюаров)
- Наличие двух встроенных программных замораживателей
- Безопасность и защита
- Полузакрытая система сокращает воздействие азота на оператора
- Источник бесперебойного питания позволяет разместить/извлечь образец в случае отключения электричества
- Параметры 24-х часового контроля и управления доступом включают в себя: Мониторинг уровня жидкого азота
- Пароль для доступа

Интегрированный программный замораживатель

- Минимизирует температурные колебания
- Отсутствует этап ручного переноса образца из программного замораживателя в дьюар для хранения

Криоконтейнер на 25 мл

- Постоянный геометрический размер образца
- Воспроизводимый процесс заморозки для каждой единицы
- Возможность роботизированной закладки на хранение и извлечение образцов
- Снижается вероятность ошибки, связанной с человеческим фактором

Система управления образцом

- Использование штрих-кода исключает ошибки при перемещении образца
- Отчет по образцу:
- История образца
- Инвентаризация
- График замораживания

www.thermogenesis.ru

Расходные материалы для культивирования стволовых клеток «CellGenix» (Германия):

Комплекты CellGro для культивирования клеток в закрытых системах.

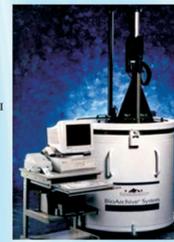
- CellGro HPC для культивирования гемопоэтических клеток, NK-клеток, Т-клеток
- CellGro DC для культивирования дендритных клеток
- Бессывороточные среды CellGro:
- SCGM для культивирования: гемопоэтических прогениторных клеток, NK-клеток, Т-клеток
- DC для культивирования дендритных клеток

Культуральные мешки VueLife

(сделаны из FEP TeFlon)

CellGro цитокины

Для увеличения гемопоэтических прогениторных клеток, NK-клеток, Т-клеток и дендритных клеток.



thermogenesis

Вся продукция зарегистрирована и сертифицирована в России