



Н. И. Мезен¹, Э. К. Сидорович², З. Б. Квачева³, С. В. Пинчук³, Н. А. Антонец³

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОГО ЭФФЕКТА НЕКОТОРЫХ ПРЕПАРАТОВ
И ИХ СОЧЕТАНИЙ НА КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ АСТРОГЛИАЛЬНЫЕ
КЛЕТКИ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИИ И РЕОКСИГЕНАЦИИ,
МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТРЕССА. Сообщение 1**

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,

ГУ «РНПЦ неврологии и нейрохирургии»²,

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»³

В статье представлены разработанные модели стрессовых воздействий на астроглиальные клетки в культуре, имеющие место при ишемических повреждениях мозга и изучен протективный эффект некоторых лекарственных препаратов и их сочетаний (группиносина, симвастина (статины), цефтриаксона) на нейроглиальные клетки, культивируемые в различных стрессовых ситуациях. Именно астроциты сейчас являются главной мишенью изучения при моделировании условий гипоксии и разработке новых подходов к антигипоксическим препаратам. Реализация такого подхода на практике обозначает необходимость подбора не одного или двух нейропротективных препаратов, а целой схемы нейропротективного лечения, то есть подбор комбинации препаратов с разнонаправленным протективным действием, что, по мнению многих авторов, позволит совершить прорыв в изучении проблемы нейропротекции при инсультах и др. патологиях.

Ключевые слова: гипоксия, астроциты, культура клеток, инсульт, группиносин, симвастин, цефтриаксон.

N. I. Mezen, E. K. Sidorovich, Z. B. Kvacheva, S. W. Pinchuk, N. A. Antonewich

STUDY OF THE PROTECTIVE EFFECT OF MEDICAL PREPARATIONS AND THEIR COMPOUNDS ON ASTROGLIAL CELLS CULTIVATED UNDER THE INFLUENCE OF HYPOXIA, REOXIGENATION, AND METABOLIC STRESS. Report 1

The article represents the developed models of stress impact on astroglial cells in culture, in case of cerebral ischemic impairments. The protective effect of certain medical preparations and their compounds (groprinasin, simvastatin, ceftriaxon) on astroglial cells cultivated in various stress situations were studied. It is now red blood cells that are the main target of the study in modeling conditions of hypoxia and the development of new approaches to antihypoxic preparations. In practice the implementation of this approach indicates the necessity of selection is not one or two neuroprotective treatment, ie the selection of preparation combination with multi-directional protective effect. In the opinion of many authors it will allow study the problems of neuroprotection in treating strokes and other pathologic conditions.

Key words: hypoxia, astrocytes, culture cells, stroke, groprinasin, simvastatin, ceftriaxon.

Гипоксия – один из факторов и ведущее звено механизмов повреждения клеток нервной ткани, возникающих при многих патологиях нервной системы, а так же и при инсультах. Именно астроциты сейчас являются главной мишенью изучения при моделировании условий гипоксии и разработке новых подходов к антигипоксическим препаратам. В последнее время особое внимание уделяется другому направлению исследований – изучению возможностей расширения «терапевтического окна» [8, 9, 10]. Наибольший интерес для изучения в этом направлении представляют такие группы препаратов, как антагонисты глутамата, антиоксиданты, блокаторы кальциевых каналов, хелаторы кальция и некоторые другие [1, 8, 9, 13]. Реализация такого подхода на практике обозначает необходимость подбора не одного или двух нейропротективных препаратов, а целой схемы нейропротективного лечения, то есть подбор комбинации препаратов с разнонаправленным протективным действием, что, по мнению многих авторов, позволит совершить прорыв в изучении проблемы нейропротекции при инсультах и др. патологиях ЦНС [1, 11, 10, 12]. Однако большинство таких средств в международных клинических испытаниях не показали убедительных результатов и на клеточном уровне изучены недостаточно [8, 9].

Таким образом, **целью данной работы явилось: разработка модели стрессовых воздействий на астроглиальные клетки в культуре, и изучение протективного эффекта различных лекарственных препаратов и их сочетаний (гропринозина, симвастина (статины), цефтриаксона) в данных модельных условиях.**

Материалы и методы

Приготовление культур клеток мозга крысы проводилось как описано ранее [2–5].

Приготовление стоковых растворов и разведений препаратов симстатина, гропринозина и цефтриаксона проводили следующим образом: гропринозин (Гр): 500 мг препарата (таблетка) растворяли в 50 мл среды DMEM/F-12 (1:1) до концентрации 10000 мкг/мл (стоковый раствор), из которого готовили дальнейшие разведения. Исследовали влияние на культуры клеток мозга крысы концентраций: 80 мкг/мл (Г7), 40 мкг/мл (Г6), 250 мкг/мл (Г5), 125 мкг/мл (Г4), 63 мкг/мл (Г3).

Симвастатин (С): 20 мг препарата (таблетка) растворяли в 20 мл среды DMEM/F-12 (1:1) до концентрации 1000 мкг/мл (стоковый раствор). Далее проводили последовательные разведения стокового раствора (10^0) в 10 раз до 10^{-6} и 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , что соответствовало 4-ем исследуемым концентрациям препарата 0,001 мкг = 1 нг/мл (C^6); 0,1 нг/мл (C^7); 0,01 нг/мл (C^8); 0,001 нг/мл (C^9);

Цефтриаксон (Ц): 1 г препарата (порошок) растворяли в 100 мл среды DMEM/F-12 (1:1) до концентрации 10000 мкг/мл (стоковый раствор). Исследовали действие концентрации) – 1–0,001 нг/мл, (разведение в 200 раз.)

Внесение препаратов симстатина, гропринозина и цефтриаксона в культуры клеток мозга крысы. Культуры клеток

мозга крысы 5-ого пассажа для последующего измерения антиоксидантного статуса и вязкости мембранных липидов культивировали на 24-луночных планшетах или на стеклах в пенфлаконах для последующей фиксации и оценки морфологии культивировали в среде DMEM с 10% FBS на протяжении 3 суток. Затем проводили смену среды на DMEM (1:1) с 2% FBS (контрольные лунки) либо на DMEM с 2% FBS и различными концентрациями и сочетаниями 3-х препаратов. Учет результатов проводили через 18 часа культивирования после внесения препаратов в условиях нормоксии и гипоксии.

Моделирование условий гипоксии: культуры клеток мозга крысы 2–5-ого пассажей культивировали в среде DMEM/F-12 (1:1) с 10% FBS на протяжении 3 суток в CO_2 -инкубаторе при +37 °C и 95% влажности (условия нормоксии) до достижения конfluence монослоя, затем культуры переносили в гипоксическую камеру с газовой смесью: 95% азота и 5% кислорода или 12% кислорода, подающейся в камеру с помощью смесителя-дозатора газов при +37 °C, на 18–24 часов. Оценку гипоксического воздействия на культуры нейроглиальных клеток по исследуемым показателям проводили, извлекая их из гипоксической камеры и перенося на 90 мин в обычный термостат при 37 °C для создания условий реоксигенации. Контролем служили культуры астроцитов, которые инкубировали в течение соответствующего периода времени в условиях нормы CO_2 инкубатор, 37 °C. Через указанные сроки оценивали морфологию живых клеток, архитектуру монослоя, а также клетки фиксировали спиртом, окрашивали гематоксилином и эозином и анализировали митотическую активность. Оценивали форму, размер клеток, ядер, наличие и длину отростков, архитектуру монослоя. Пролиферативную активность клеток на разных вариантах сред оценивали по митотической активности и средним данным накопления клеток в 3-х культуральных флаконах и пересчету их количества на 1 мл культуральной среды общепринятым методом в камере Горяева и соотношении количества к посеянным, выражали индексом пролиферации. Жизнеспособность клеток определяли с использованием пропидиум иодида (PI) и флуоресцеин диацетата (FDA) методом проточной цитофлуориметрии. Пропидиум иодид (2 мкг/мл) добавляли в суспензию клеток за 2 мин перед измерением, флуоресценцию клеток регистрировали в диапазоне 675/30 нм (канал регистрации PerCP) при возбуждении 488 нм. В присутствии флуоресцеин диацетата (0,5 мкг/мл) клетки инкубировали в течение 20 мин, флуоресценцию регистрировали в диапазоне 530/30 нм (канал регистрации FITC) при возбуждении 488 нм. К жизнеспособным относили клетки, положительные по FDA и отрицательные по PI на двойной диаграмме интенсивности флуоресценции в канале FITC и PerCP. Клетки, отрицательные по FDA и положительные по PI (гейт P3), относили к некротическим, а отрицательные по FDA и PI – к опотическим. При обработке экспериментальных данных вычисляли среднестатистические величины, их доверительные интервалы и проводили оценку достоверности различий между исследуемыми группами с помощью критерия Стьюдента [6].

Результаты и обсуждение

Изучение влияния различных концентраций препаратов и их сочетаний на морфологию клеток культур мозга крысы в условиях нормоксии

На рис. 1 представлена морфология контрольной культуры, находящейся в логарифмической стадии роста: популяция клеток состоит из клеток – предшественников астроцитов, часть из них содержит слабо ветвящиеся отростки, образующие слабо выраженные глиальные сети, характерные для дифференцированных астроцитов, ядра содержат несколько крупных ядрышек, встречаются митотически делящиеся клетки. Популяция клеток сформированного монослоя в поздней логарифмической фазе роста культуры (4–5 сутки *in vitro*) представлена в основном протоплазматическими и фибриллярными астроцитами, содержится небольшое количество олигодендроцитов, стволовых клеток, клеток-предшественников нейроглии. Прижизненное светооптическое исследование динамики развития культуры мозга крысы показало, что клетки в описанных выше условиях культивирования сохраняют свои специфические черты, к которым следует отнести типичную для астроцитоподобных глиальных клеток звездчатую форму, продукцию глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) – компонента цитоскелета. Клетки *in vitro* имеют высокую митотическую активность 19,7–21,0 промилле (рис. 1, рис. 2).

Важным моментом при выборе лекарственных препаратов для лечения нарушений мозгового кровообращения ишемического типа имеет отсутствие у них отрицательных влияний на клетки нервной системы и наличие церебропротективных свойств, позволяющих обеспечить выживаемость клеток ЦНС в условиях гипоксии. Васкулярные заболевания связаны с повреждением и гибелью не только нейронов, но и других клеток ЦНС. Поэтому Young R. et al. (2007) считают, что, вероятно, проблема состоит в том, что исследователи концентрируют внимание на защите нейронов. Инсульт – это не только повреждение и гибель нейронов, это болезнь головного мозга в целом. Поэтому нейропротекция должна состоять в защите не только нейронов, но и астроцитов, олигодендроцитов, микроглии и всех механизмов, нарушающихся при ишемии. Проведенный анализ литературных данных по изучению протекторных свойств исследуемых соединений в отношении клеток ЦНС, показал, что они не многочисленны и противоречивы. Имеются единичные исследования по цитотоксичности статинов и антибиотика гропренозина. Все выше изложенное и явилось обоснованием для проведения исследований.

В предварительных исследованиях были установлены максимально-переносимые дозы препаратов в культурах клеток мозга крысы и исследовано их влияние на морфологию клеток. Гропренозин (Г) в опытах использовали в интервале концентраций: 125–40 мкг/мл; статин (симвастатин), (С) – 1–0,001 нг/мл, цефтриаксона (Ц) – 50 мкг/мл. Было установлено, что препараты в выше названных дозах не влияют на митотическую активность клеток и не оказывают выраженного цитотоксического действия в условиях 24 часовой инкубации с ними без изменения условий культивирования нейроглиальных клеток (10%-е содержание сыворотки в питательной среде), рис. 3–8.

Тем не менее, установлены некоторые особенности морфологии клеток при их инкубации с гропренозином. Как показано на рис. 3 инкубация клеток с гропренозином в дозах 40–80 мкг/мл индуцирует дифференцировку клеток – отмечается появление у них большего количества ветвящихся отростков, образующих глиальные сети, характерные для дифференцированных астроцитов (рис. 3).

На следующем этапе исследований было оценено одно из стрессовых условий воздействия на клетки – уменьшение сыворотки в питательной среде в условиях и влияние препаратов в этих условиях на выживаемость клеток, вязкость мембран-

ных липидов и внутриклеточное содержание супероксид анион радикала. На основании полученных данных, можно сделать вывод, что все исследуемые концентрации препаратов и их сочетаний не вызывают статистически значимого влияния на содержание в культурах жизнеспособных, апоптотических и некротических клеток в условиях нормоксии после 24 воздействия на клетки. Также не отмечено достоверного влияния на вязкость мембранных липидов клеток ($P < 0,5$). Внутриклеточное содержание супероксид анион радикала при внесении отдельно симвастатина, гропренозина или цефтриаксона не изменялось по отношению к контролю. Только сочетание гропренозина с симвастатином (все 4 исследуемые варианта) приводило к небольшому снижению содержания радикала. Отмеченная тенденция может свидетельствовать о том, что при низком содержании сыворотки в среде культивирования (2%), а это является стрессовым фактором для культур, сочетанное внесение гропренозина и симвастатина оказывает протекторное влияние на клетки мозга крысы, повышая их антиоксидантный статус. Следует отметить, показатели жизнеспособности клеток после проведенной прободготовки (через 2 часа после перевода клеток из монослоя в суспензию) снижались незначительно во всех исследуемых образцах (на 1–6%).

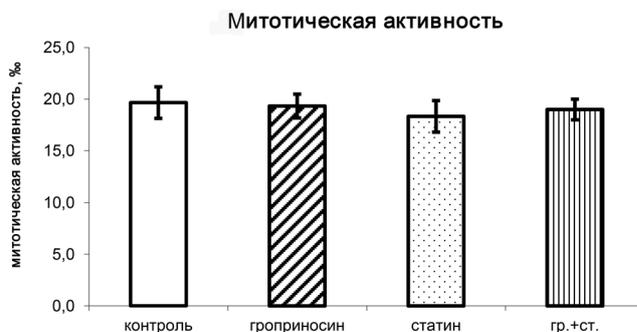


Рис. 1. Влияние препаратов и их сочетаний на митотическую активность клеток после 24 часовой инкубации с астроглиальными клетками в условиях нормоксии

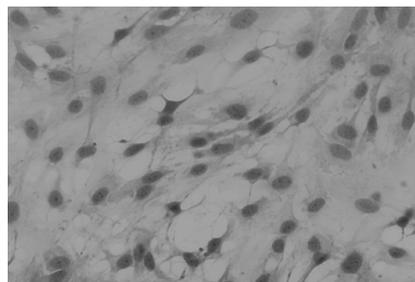


Рис. 2. Морфология астроцитов в контрольной культуре в логарифмической стадии роста (4-е сутки после пересева). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200 раз

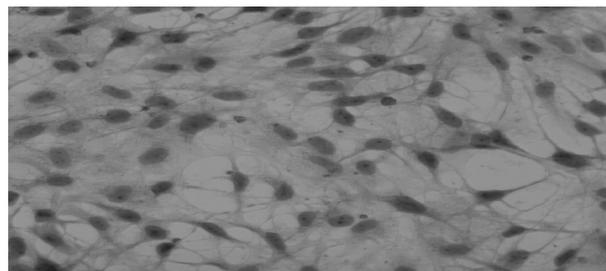


Рис. 3. Влияние гропренозина (80 мкг/мл) на дифференцировку астроглиальных клеток в культуре. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200 раз

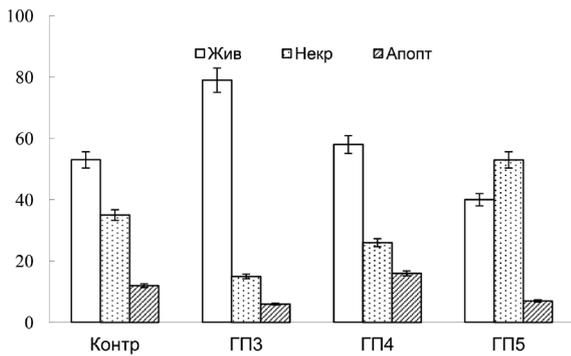


Рис. 4. Влияние культивирования в бессывороточной среде в присутствии различных концентраций глорприносина на содержание жизнеспособных, некротических и апоптотических клеток в культуре

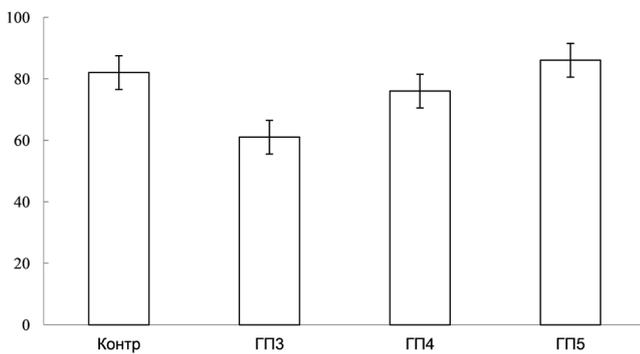


Рис. 5. Влияние культивирования астроцитов в присутствии различных концентраций глорприносина на интенсивность флуоресценции в клетках зонда CM-H₂DCF-DA

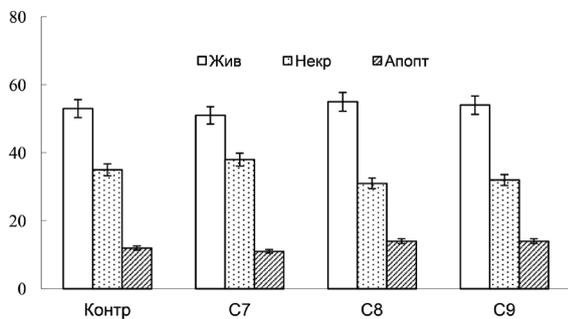


Рис. 6. Влияние культивирования в присутствии различных концентраций статина на содержание жизнеспособных, некротических и апоптотических клеток в культуре астроглиальных клеток

Кроме того, было изучено влияние препаратов на те же морфофункциональные показатели клеток: жизнеспособность, состояние их мембран, при их инкубировании с культурами в бессывороточной среде. Как видно из рис. 4 при культивировании астроглиальных клеток в бессывороточной питательной среде значительно снижается (в 1,8 раза) количество жизнеспособных клеток, до 37% составляют некротические клетки и 11% – с апоптозом.

Культивирование астроглиальных клеток (АК) в присутствии глорприносина в этих же условиях изменяло содержание в культуре жизнеспособных, некротических и апоптотических клеток в зависимости от концентрации данного препарата (рис. 4). По сравнению с контролем при концентрации препарата Г3 (63 мкг/мл) наблюдалось увеличение количества жизнеспособных клеток и снижение некротических почти в 2 раза. При двукратном увеличении концентрации препарата до Г4 (125 мкг/мл)

и Г5 (250 мкг/мл) жизнеспособность астроцитов снижалась с

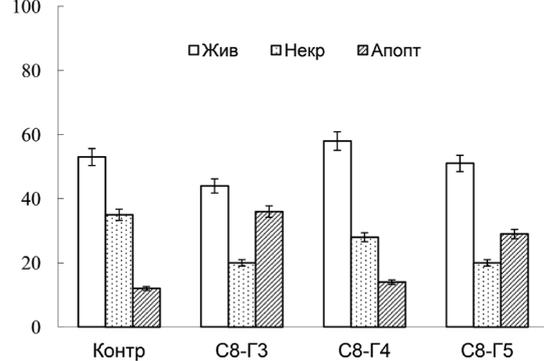


Рис. 7. Влияние культивирования в присутствии различных концентраций глорприносина и статина на содержание жизнеспособных, некротических и апоптотических клеток в культуре астроглиальных клеток

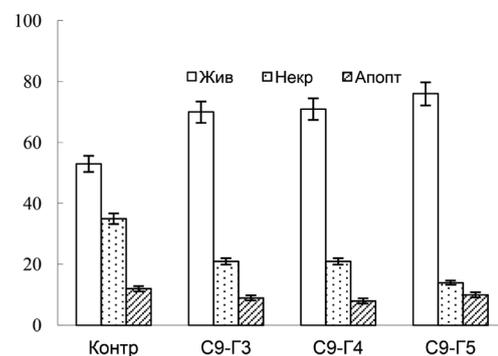


Рис. 8. Влияние культивирования в присутствии различных концентраций глорприносина и статина на содержание жизнеспособных, некротических и апоптотических клеток в культуре астроглиальных клеток

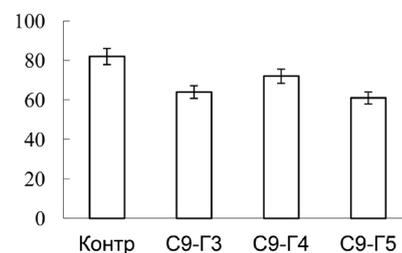


Рис. 9. Влияние культивирования НК в присутствии различных концентраций глорприносина и симвастатина на интенсивность флуоресценции в клетках зонда CM-H₂DCF-DA

увеличением процесса некроза и апоптоза. Эти данные хорошо коррелировали с уровнем свободно-радикальных окислительных процессов в клетках. Как видно из рис. 4, при концентрации Г3 (63 мкг/мл) наблюдалось снижение интенсивности протекания окислительных процессов в клетках, что указывало на их более высокий антиоксидантный статус. При изменении концентрации препарата до Г4 и Г5 (125–250 мкг/мл) наблюдалась интенсификация окислительных процессов, при этом при концентрации Г5 данный параметр был выше, чем в контроле. Таким образом, глорприносин при концентрации Г3 оказывал защитное действие на астроглиальные клетки, а при изменении концентрации до Г5-токсическое с развитием окислительного стресса.

Статин (С) при инкубировании с клетками в бессывороточной среде в диапазоне концентраций С7-С9 (0,1 нг/мл–0,001 нг/мл) не значительно изменял параметры жизнеспособности



астроглиальных клеток (рис. 6). При сочетанном действии статины и гропринозина на клетки выявлялся протективный эффект препаратов. При концентрации статины С8 (0,01 нг/мл) и ГЗ (63 мкг/мл) (рис. 7) это проявляется в преобладании апоптотических клеток над некротическими в суспензии АК (С8-ГЗ, С8-Г5). Использование статины в концентрации С9 (0,001 нг/мл) (рис. 8) приводит к увеличению количества жизнеспособных клеток и снижению некротических для всех концентраций гропринозина. При этом если в концентрации Г5 гропринозин в отсутствие статины оказывал токсическое действие на АК, то в комбинации со статином – выраженное протективное. О защитном действии препаратов при их комбинированном применении свидетельствует также снижение окислительных процессов в АК по сравнению с контролем (рис. 7, рис. 8). Существенного влияния гропринозина, статины в данных дозах и их сочетанных комбинаций на связывание потенциал-чувствительного зонда Мс540 не наблюдается, что свидетельствует об отсутствии изменения трансмембранного потенциала клеток под воздействием препаратов (рис. 5, рис. 9).

Выводы

1. Дана морфо-функциональная характеристика культивируемых астроцитов мозга в условиях нормоксии и гипоксии.
2. Культивирование астроцитов в питательной среде при уменьшении содержания в ней сыворотки снижает количество жизнеспособных клеток, при этом значительно увеличивается количество некротических и апоптотических клеток.
3. Выявлена особенность действия препарата гропринозина на клетки мозга в культуре в условиях нормоксии, которая выражается в индукции к дифференцировке предшественников астроглиальных клеток, появлению у последних ветвящихся отростков, формирующих глиальные сети.

Литература

1. Аронов, Д. М. Плейотропные эффекты статинов. Русский медицинский журнал. – 2001. – Т. 9, № 13. – С. 2–7.

2. Квачева, З. Б., Недзьведь М. К., Рытик П. Г. и др. Длительное культивирование клеток мозга человека и их морфологическое изучение. – Материалы I Всесоюзного симпозиума «Возбудимые клетки в культуре тканей». – Пушино, 1984, с. 108–111.

3. Лосев, Ю. П., Федулов А. С., Мезен Н. И. Ингибиторы перекисного окисления липидов в внутримолекулярным синергизмом. – Доклады Национальной академии наук Беларуси 1999, т. 3, № 3, с. 5.

4. Мезен, Н. И., Федулов А. С., Квачева З. Б., Лобанок Е. С., Шуканова Н. А., Илькевич Ю. Г., Шадыро О. И. Нейропротективные свойства антиоксиданта Т-3 из группы двухатомных фенолов при гипоксическом повреждении астроцитов *in vitro*. – Сборник материалов симпозиума «Биоантиоксидант», Тюмень, сентябрь 1997.

5. Мезен, Н. И., Квачева З. Б., Федулов А. С., Олешкевич Ф. В. Шадыро О. И., Тимошук В. А. Влияние гипоксии на морфо-функциональные параметры астроцитов в монослойной культуре. – Бюл. Экспер. Биологии и медицины 1996, № 11, т. 122, с. 581–584.

6. Полтавцева, Р. А., Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа. – 1967. – 322 с.

7. Федулов, А. С., Мезен Н. И., Квачева З. Б., Илькевич Ю. Г., Полещук Н. Н., Карапетян Г. М. Влияние гипоксии на морфофункциональное состояние культуры астроцитов и протекторный эффект диафена. Сб. материалов конференции «Молекулярная генетика и биотехнология» 6–8 апреля 1998 г., г. Минск, с. 118–121.

8. Шахтмейстер, И. Я.: Новый иммуно-корректор гропринозин в терапии дерматозов Новые лек. преп., Москва 1994, 5, стр. 9–19. – 3. Тезисы докладов VII Росс. Съезда дерматовенерологов. Новое в лечении хронических и системных заболеваний. Казань, Медицина 1996, часть I.

9. Bacigaluppi, M., Hermann D. M. New targets of neuroprotection in ischemic stroke. *Scientific World Journal* 2008; 13; 8: 698–712.

10. Ginsberg, M. D Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 2008. [Epub ahead of print]

11. Donnan, G. A A New Road Map for Neuroprotection. *The 2007 Feinberg Lecture. Stroke* 2008; 39: 242.

12. Wahlgren, N. G., Ahmed N Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies – the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis* 2004; 17 Suppl 1: 153–66

13. Zacco, A., Togo J., Spence K. et al. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity *The J. of Neuroscience*. – 2003. – V.23, N 35. – P. 11104–11111.

14. Yi-Bing, Ouyang, Ludmila A. Voloboueva, Li-Jun Xu, and Rona G. Giffard Selective Dysfunction of Hippocampal CA1 Astrocytes Contributes to Delayed Neuronal Damage. after Transient Forebrain Ischemia. *The Journal of Neuroscience*, 18 April 2007, 27(16): 4253–4260.