

Н. И. Мезен¹, Э. К. Сидорович², З. Б. Квачева³,
С. В. Пинчук³, Н. А. Антоневиц³

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОГО ЭФФЕКТА НЕКОТОРЫХ ПРЕПАРАТОВ
И ИХ СОЧЕТАНИЙ НА КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ АСТРОГЛИАЛЬНЫЕ
КЛЕТКИ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИИ И РЕОКСИГЕНАЦИИ,
МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТРЕССА. Сообщение 2**

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 2

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, ceftriaxson) on astroglial cells cultivated in various stress situations was 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, ceftriaxson

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, 7, 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, 12]. Однако большинство таких средств в международных клинических испытаниях не показали убедительных результатов и на клеточном уровне изучены недостаточно [8, 9, 13].

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 (гроприносина, симвастина (статины), цефтриаксона) в данных модельных условиях.

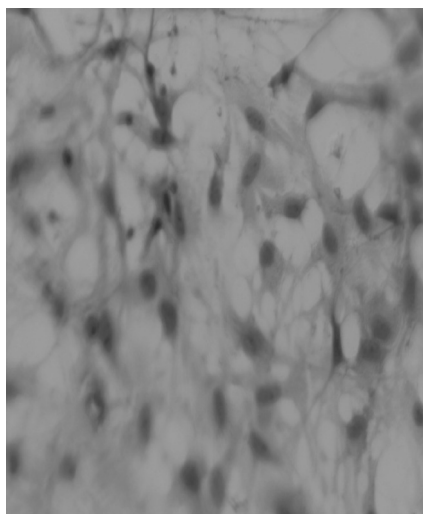


Рис. 10. Морфологические проявления гипоксического воздействия (18 час.) на астроглиальные клетки (отек клеток, апоптоз, укорочение отростков)

Материалы и методы

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

Приготовление стоковых растворов и разведений препаратов симстатина, гроприносина и цефтриаксона проводили следующим образом: гроприносин (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, гроприносина 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

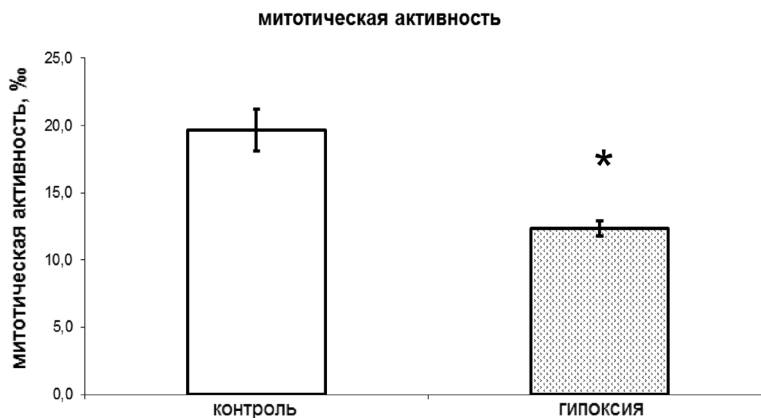


Рис. 11. Влияние гипоксии на митотическую активность нейроглиальных клеток

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 оптоическим. При обработке экспериментальных данных вычисляли среднеарифметические величины, их доверительные интервалы и проводили оценку достоверности различий между исследуемыми группами с помощью критерия Стьюдента [6].

Результаты и обсуждение

Изучение протективного эффекта различных концентраций препаратов и их сочетаний на астроглиальные клетки культур мозга крысы в условиях гипоксии (5% содержание кислорода)

Моделирование и отбор критериев гипоксического повреждения астроглиальных клеток. Выбор условий и критериев оценки гипоксического влияния на различные типы клеток мозга в условиях культуры зависит от поставленных экспериментатором задач. Анализ литературных данных показал, что в настоящее время существует несколько подходов к моделированию условий ишемии на клетки мозга в условиях культуры. Одни из них заключаются в снижении содержания кислорода до 2–5% в газовой смеси. Культуры клеток могут подвергаться депривации кислорода от 15 минут до 24 часов в зависимости от того, какие параметры планируют оценивать исследователи. Ранние эффекты гипоксического влияния связаны с изменения-

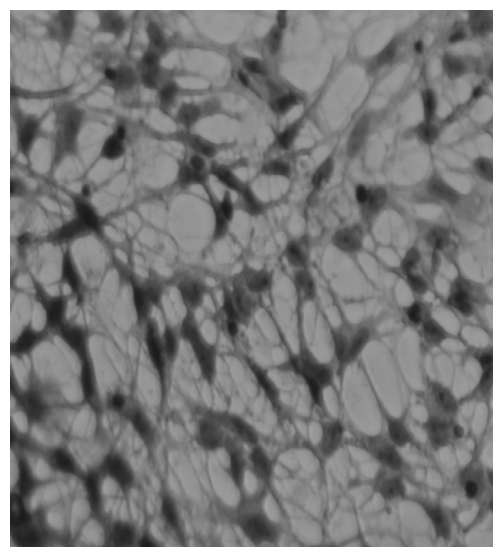


Рис. 12. Протективное действие препаратов гроприносина и симвастина в исследуемых дозах, инкубируемых с клетками в условиях гипоксии. Сохранность клеток и ядер, хорошо развитая глиальная сеть, сформированная из отростков астроглиальных клеток, в стадии дифференцировки

ми внутри- и внеклеточной концентрации различных ионов, метаболитов, активации экспрессии генов, вовлеченных в защитный ответ клетки и др. Более поздние эффекты, например изменение морфологии клеток, их жизнеспособность можно оценивать как сразу после длительного воздействия низких концентраций кислорода (например, спустя 16–24 часа), так и в период реоксигенации культуры в течение нескольких суток. Помимо депривации кислорода, можно усугублять повреждающее влияние гипоксии удалением энергетического субстрата (глюкозы) из среды культивирования. Также существует модель метаболических условий гипоксии, окислительного стресса и глутаматной эксайтотоксичности. Кроме оптимизации и стандартизации условий моделирования ишемии важным аспектом является выбор типа клеток, на которых *in vitro* оцениваются различные параметры. Локальная ишемия мозга ведет к патологическим изменениям, которые запускают каскад биохимических реакций. Следствием является активация механизмов некроза и апоптоза нейронов и необратимое повреждение нервной ткани.

Гипоксическое воздействие на культуры при содержании в камере 5% кислорода и 95% азота в течение 18 часов не вы-

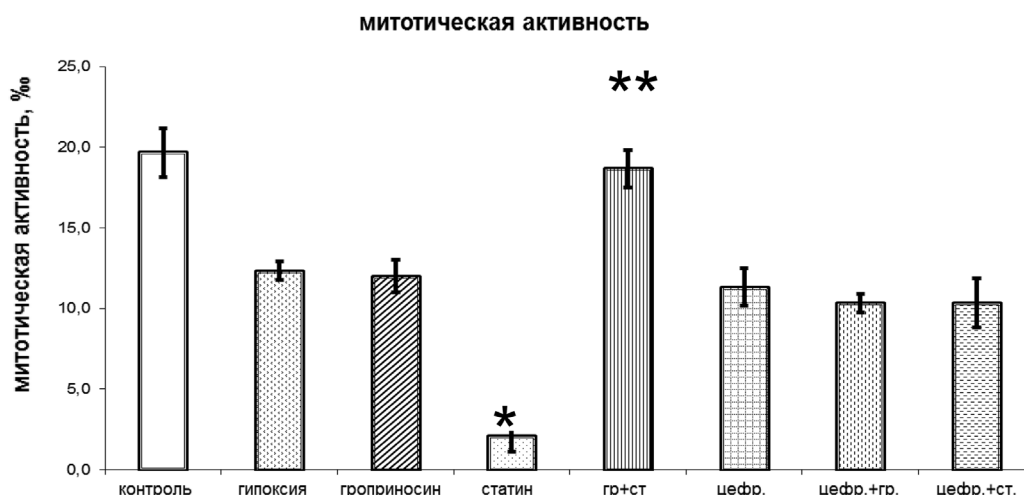


Рис. 13. Влияние препаратов (гроприносина, статина, цефтриаксона) и их сочетаний в условиях гипоксии на митотическую активность нейроглиальных клеток

зывает выраженной деструкции монослоя клеток. Характерными морфологическими признаками раннего проявления гипоксии на клетки является клеточный отек, замедление деления клеток деструкция отростков. Так, нами установлено, что клеточный отек имеет локальный характер в монослое. Гипертрофированных клеток (отек клеток) содержалось 10–15%, кроме того 20–23% имели пикнотические и апоптотические фрагментированные ядра, укороченные отростки (рис. 10). При этом отмечалось снижение митотической активности клеток по сравнению с контролем на 62%.

Влияние препаратов в условиях гипоксии (5% содержание кислорода) на морфофункциональные характеристики астроглиальных клеток

Инкубация культур клеток при нормальном содержании сыворотки (10%) с препаратами статином и цефтриаксоном и их сочетаниями не предотвращала гипоксических повреждений клеток: число отечных и клеток с морфологическими признаками апоптоза достоверно не изменялось ($P < 0,5$) и оставалось на одном уровне с контролем: 12–17% и 23–27%, соответственно.

Отмечено снижение митотической активности астроглиальных клеток, инкубированных со статином по сравнению с контрольными культурами, находящимися в условиях гипоксии без препарата ($P > 0,5$), (рис. 10).

Инкубация клеток с гроприносином (дозы 80 мкг\мл и 63 мкг\мл) и статином

(0,01 нг\мл и 0,001 нг\мл) одновременно наблюдалось защитное действие, которое проявлялось в снижении отечных клеток и сохранении уровня митотической активности, приближаясь к контрольным (рис. 11).

В условиях 18 часового гипоксического воздействия на нейроглиальные клетки с последующим переводом их в условия реоксигенации, присутствие в питательной среде препаратов гроприносина и статина, а также их комбинации, приводило к более значительному сохранению жизнеспособности клеток, что проявлялось снижением числа некротических и апоптотических клеток (рис. 12).

Более выраженное протекторное действие данных лекарственных препаратов на жизнеспособность нейроглиальных клеток проявлялось при инкубации клеток в условиях метаболического стресса, индуцированного переводом клеток в пита-

тельную среду без сыворотки. Инкубация астроцитов в бессывороточной среде в течение 90 мин при 37С приводила к гибели клеток. Так инкубация в такой среде НК, культивированных в условиях нормоксии, приводила к гибели 39% клеток, культивированных в условиях гипоксии количество жизнеспособных клеток снижалось на 32%. Препараты Г, С и их сочетание увеличивали устойчивость клеток к стрессовому воздействию: снижение количества жизнеспособных клеток в этих условиях составляло 26%, 28% и 20%, соответственно (рис. 13). Препарат цефтриаксон напротив значительно увеличивал гибель клеток в условиях метаболического стресса: количество жизнеспособных клеток снижается на 45%, при этом гроприносин и статин оказывали некоторое защитное действие, снижая гибель клеток до 40%.

Выводы

1. Установлено протекторное действие комбинации препаратов гроприносина в дозах 80–40 мкг/мл и статина – 1–0,001 нг/мл, при инкубации их с клетками в условиях гипоксии и метаболического стресса, что проявлялось в увеличении устойчивости клеток к стрессовому воздействию: снижение количества жизнеспособных клеток в этих условиях составляло 26%, 28% и 20%, соответственно, а при гипоксии 32%.

2. Цефтриаксон в условиях гипоксии в дозе 50 мкг/мл не оказывал протекторного действия на клетки.

Литература

1. Аронов, Д. М. Плейотропные эффекты статинов. Русский медицинский журнал. – 2001. – Т. 9, № 13. – С. 2–7.
2. Квачева, З. Б., Недзведь М. К., Рытик П. Г. и др. Длительное культивирование клеток мозга человека и их морфологическое изучение. – Материалы I Всесоюзного симпозиума «Возбудимые клетки в культуре ткани». – Пущино, 1984, с. 108–111.
3. Лосев, Ю. П., Федулов А. С., Мезен Н. И. Ингибиторы перекисного окисления липидов с внутримолекулярным синергизмом. – Доклады Национальной академии наук Беларуси 1999, т. 3, № 3, с. 5.
4. Мезен, Н. И., Федулов А. С., Квачева З. Б., Лобанов 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 гроприносин 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. *Vacigaluppi, 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.

Поступила 19.12.2014 г.