

*Н. И. Мезен¹, Э. К. Сидорович², З. Б. Квачева³,
А. Г. Полешко³, С. В. Пинчук³*

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
И ИХ СОЧЕТАНИЙ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ
СОСТОЯНИЕ АСТРОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ В УСЛОВИЯХ
ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИИ И РЕОКСИГЕНАЦИИ**

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
ГУ «РНПЦ неврологии и нейрохирургии»²,
ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»³*

*В статье представлено описание разработанных моделей стрессовых воздействий на астро-
глиальные клетки в культуре, имеющие место при ишемических повреждениях мозга, и изучен*

протективный эффект некоторых лекарственных препаратов и их сочетаний (гроприносина, симвастина (статины), цефтриаксона). Астроциты являются главной мишенью изучения при моделировании условий гипоксии и разработке новых подходов к нейропротекции. 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 позволит совершить прорыв в изучении проблемы нейропротекции при инсультах и др. патологиях.

Ключевые слова: гипоксия, астроциты, культура клеток, инсульт, гроприносин, симвастин, цефтриаксон, экспрессия гена HIF1 α .

**N. I. Mezen, E. K. Sidorovich, Z. B. Kvacheva,
A. G. Poleschko, S. W. Pinchuk**

**STUDY OF THE PROTECTIVE EFFECT
OF MEDICAL PREPARATIONS AND THEIR COMBINATIONS
ON STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE
OF ASTROGLIAL CELLS CULTIVATED UNDER
THE INFLUENCE OF HYPOXIA, REOXIGENATION**

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 astrocytes that are the main target of the study in modeling conditions of hypoxia and the development of new approaches to antihypoxic preparations in vitro. 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, expression of Hif1 α gene.

Ранние эффекты гипоксического влияния связаны с изменениями внутри- и внеклеточной концентрации различных ионов, метаболитов, активации экспрессии генов, вовлеченных в защитный ответ клетки [9, 10]. Известно, что Hif1 является основным транскрипционным фактором, обеспечивающим адаптацию клеток к воздействию на них низких концентраций O₂. Как известно, Hif1 состоит из 2-х субъединиц: α -субъединицы, которая деградирует при атмосферном содержании O₂ (21 %) и экспрессирующейся на одном уровне при различном содержании O₂ в среде β -субъединицы. Экспрессия именно α -субъединицы обеспечивает стабилизацию рассматриваемого транскрипционного фактора в функционально активный белковый комплекс. Описан широкий спектр Hif-1-зависимых генов-мишеней и ответственных за синтез адаптивных белков в ответ на гипоксию [2, 3], которые способствуют улучшению доставки кислорода (эритропоэза, ангиогенеза), транспорту глюкозы и ионов, усилению гликолитической продукции АТФ, и клеточной пролиферации. Продукты, регулируемые Hif-1, действуют на разных функциональных уровнях. Конечным результатом такой активации является увеличение поступления O₂ в клетку [1, 2, 7].

Целью данной работы явилось: разработка схемы нейропротекторного действия на основе различных лекарственных препаратов и их сочетаний (гроприносина,

симвастина (статины), цефтриаксона) путем отбора критериев оценки восстановления структурно функциональных свойств астроцитов в условиях воздействия гипоксии и метаболического стресса.

Материалы и методы

Приготовление культур клеток мозга крысы и приготовление стоковых растворов и разведений препаратов проводилось, как описано ранее [5].

Определение вязкости мембранных липидов: вязкость липидного бислоя плазматической мембраны клеток оценивали по степени поляризации флуоресценции зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (ДФГТ). Для встраивания зонда в липидный бислой суспензию клеток ($2 \cdot 10^5 - 3 \cdot 10^5$ кл/мл) в PBS инкубировали в темноте в присутствии ДФГТ (1 мкМ) в течение 45–60 мин при 37 °С. Флуоресценцию зонда регистрировали при 430 нм ($\lambda_{возб} = 362$ нм). Степень поляризации (P) флуоресценции ДФГТ рассчитывали по формуле: $P = (I_{\parallel} - G I_{\perp}) / (I_{\parallel} + G I_{\perp})$, где I_{\parallel} – интенсивность флуоресценции ДФГТ когда поляризатор на возбуждение ориентирован параллельно поляризатору на регистрацию, I_{\perp} – интенсивность флуоресценции ДФГТ когда поляризатор на возбуждение ориентирован перпендикулярно поляризатору на регистрацию, G – фактор, отражающий различную чувствительность прибора для вертикально и горизонтально поляризованного света.

Определение потенциала плазматической мембраны: оценку изменения потенциала плазматической мембраны клеток проводили с использованием потенциал-чувствительного зонда мероцианина 540 (Mц540). К 0,5 мл 10^5 клеток в ДМЕМ/F-12 добавляли 1,0 мкМ Мц540 и инкубировали в темноте при 37°C в течение 5 мин. Измеряли интенсивность флуоресценции Мц540 в отдельных клетках на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) в канале PE (585/30 нм) при возбуждении 488 нм.

Определение уровня экспрессии гена *Hif1α*: сравнительный анализ уровня экспрессии гена *hif1α* в астроцитах, культивируемых в различных условиях эксперимента (гипоксия, гипоксия + разные препараты и их сочетания, снижение сыворотки в питательной среде, нормоксия) проводили методом ПЦР с использованием праймеров с оценкой наработки транскрипционного фактора *Hif1α*.

ОТ-ПЦР в реальном времени: выделение РНК из клеток проводили с использованием набора RNA queous®-4PCR Kit (Applied Biosystems Inc., США) согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по оптической плотности ее раствора, при $\lambda = 260$ нм.

Для исследований экспрессии гена белка *Hif1α* методом ОТ-ПЦР в реальном времени использовали 100 нг очищенной РНК. Синтез кДНК из РНК осуществляли с использованием набора «High Capacity RNA-to-cDNA Kit» (Applied Biosystems Inc., США) согласно руководству для пользователя. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе CFX 96 (BioRad, США) с использованием набора реагентов «TaqMan® Gene Expression Master Mix» (Applied Biosystems Inc., США) и праймеров к гену *hif1α* (кат. № Rn00577560_m1, Applied Biosystems Inc., США), соблюдая условия рекомендованные производителем. Уровень содержания мРНК анализируемых генов выравнивали по отношению к мРНК референтного гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы «TaqMan® Rodent GAPDH Control» (Applied Biosystems Inc., США).

Методы статистической обработки результатов

При обработке экспериментальных данных вычисляли среднеарифметические величины, их доверительные интервалы и проводили оценку достоверности различий с помощью непараметрических критериев. На одну точку исследования брали не менее 3-х флаконов с культурами [4].

Результаты и обсуждение

В механизмах гипоксического некробиоза клеток одну из важнейших ролей играет дезинтеграции митохондриальных мембран. Недостаток кислорода приводит к дефициту макроэргических соединений, образуемых в сопряженных с окислительно-восстановительными процессами реакциях фосфорилирования на внутренней мембране митохондрий. Низкая скорость дыхания неповрежденных митохондрий в связана с тем, что высокий мембранный потенциал (создаваемый в отсутствие

АДФ и при наличии кислорода и субстратов) препятствует переносу протонов через внутреннюю мембрану, связанному с работой дыхательной цепи, и тем самым останавливает поток электронов по этой цепи [6, 8, 9].

При сравнении мембранного потенциала митохондриальных культур астроцитов 2-х групп (нормоксия и гипоксия), установлено, что в сроки 20 часов с начала эксперимента в клетках, подвергнутых воздействию гипоксии, достоверно выше ($p = 0,02$, $n = 4$) значение отношения относительной интенсивности флуоресценции зонда JC-1 (I_{PE}/I_{FITC}), что свидетельствует о более высоком мембранном потенциале (таблица 1). Так как подобранные условия гипоксии достоверно изменяют значение мембранного потенциала митохондриальной мембраны, данный параметр можно включить в контролируемый при изучении антигипоксических эффектов лекарственных препаратов.

В результате оценки вязкости цитоплазматической мембраны астроцитов по интенсивности относительной флуоресценции зонда мероцианина 540 (Mц540) установлены достоверные различия ($p = 0,02$, $n = 4$) между клетками групп нормоксии и гипоксии (таблица 1). Известно, что Мц540 является липофильным потенциал-чувствительным зондом, молекулы которого несут отрицательный заряд. Наличие отрицательного заряда на плазматической мембране препятствует значительному связыванию Мц540 с клетками, тогда как деполяризация мембраны при гибели клеток приводит к увеличению встраивания Мц540 в клеточные мембраны. Полученные результаты изучения влияния гипоксии на трансмембранный потенциал мембраны астроцитов свидетельствуют о его увеличении на 33 % (так как флуоресценция зонда ниже, чем в нормоксии). Увеличение потенциала цитоплазматической мембраны в модельных условиях гипоксии может свидетельствовать о том, что в сроки 18–20 часов гипоксии наблюдаются как компенсаторные защитные механизмы астроцитов, так и возможна модификация компонентов мембраны, которая приводит к изменению ее потенциала. В эти сроки также возможно оценивать изменение указанного параметра под воздействием лекарственных средств.

Таким образом, на основании полученных достоверных различий в значениях мембранного потенциала митохондрий, цитоплазматической мембраны астроцитов данные показатели могут быть использованы для изучения влияния различных лекарственных препаратов в культуре астроцитов как модели гипоксического воздействия на нейроглиальные клетки (таблица 1).

Таблица 1. Изучение мембранного потенциала митохондрий, цитоплазматической мембраны астроцитов в норме и при гипоксии

Условия	Потенциал мембраны митохондрий Отношение относительной интенсивности флуоресценции зонда JC-1 I_{PE}/I_{FITC}	Вязкость цитоплазматической мембраны Интенсивность относительной флуоресценции зонда мероцианина $I_{мер}$
Нормоксия	$2,29 \pm 0,09(2,26)$	$260,7 \pm 36,2 (272,5)$
Гипоксия	$2,95 \pm 0,23(3,01)$ ($p = 0,02$)	$174,0 \pm 33,6(178)$ ($p = 0,02$)

Для оценки влияния сочетаний препаратов на данные показатели астроцитов в условиях нормоксии и гипоксии были сформированы следующие группы:

1. Контроль – без препаратов.
2. Гроприносин 80 мкг/мл + симвастатин 0,1 нг/мл (–6).
3. Симвастатин 0,1 нг/мл (–6) + цефтриаксон 50 мкг-мл.
4. Гроприносин 80 мкг/мл + симвастатин 0,1 нг/мл (–6) + цефтриаксон 50 мкг-мл.

Для изучения влияния данных сочетаний препаратов на астроциты на первом этапе проводили оценку культур, выращенных в условиях нормоксии, но с пониженным содержанием питательных веществ (2 % сыворотки). Установлено, что при совместном внесении в ростовую среду гроприносина и симвастатина (группы 2 и 4) достоверно увеличивается потенциал митохондриальных мембран астроцитов по сравнению с контрольной группой. Причем группы 2 и 4 также достоверно различались между собой по данному параметру, что может свидетельствовать о том, что дополнительное внесение цефтриаксона повышает положительный эффект совместного действия гроприносина и симвастатина. В группе 3 по сравнению с контролем (1), отмечена тенденция к увеличению потенциала, однако без достоверных отличий. Аналогичные тенденции отмечены в этих же группах культур, подвергнувшихся влиянию недостатка кислорода, однако достоверных различий не установлено (таблица 2).

Эти данные могут свидетельствовать о том, что совместное влияние гроприносина и симвастатина на астроциты заключается в стимуляции компенсаторных и адаптационных эффектов, связанных с поддержанием высокого митохондриального потенциала.

Развитие гипоксического состояния, дефицит макроэргических соединений, увеличение пассивной проницаемости цитоплазматических мембран клеток при их дезорганизации в условиях гипоксии приводят к развитию вначале частичной, а затем стойкой деполяризации клеток, невозможности их реполяризации и, соответственно, к отсутствию формирования потенциала действия, подавлению функциональной активности клеток. Одним из последствий подавления Na⁺, K-АТФ-азы и дезорганизации структурных компонентов цитоплазматических мембран, белков и липидов является избыточное проникновение в цитоплазму Na⁺ и H₂O с последующей гипергидратацией, развитием отека и «мутного набухания» клетки.

Оценка влияния изучаемых сочетаний препаратов на потенциал цитоплазматической мембраны не выявила значимых различий между группами в условиях нор-

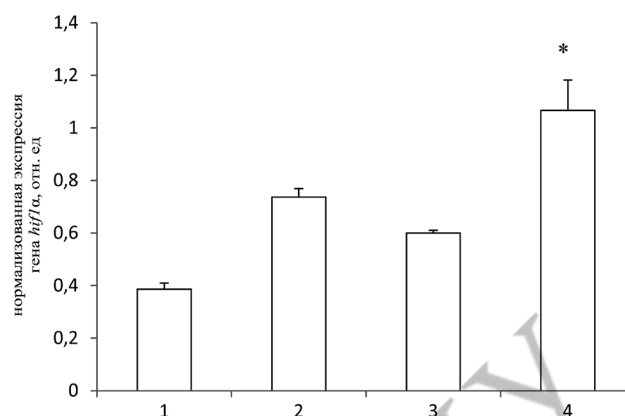


Рисунок. Влияние гипоксии на экспрессию гена белка Hif1α в астроцитах мозга крысы при их культивировании с гроприносином и симвостатином: 1 – нормоксия (21 % O₂), 2 – нормоксия (21 % O₂) + препараты (20 ч), 3 – гипоксия (2 %, 20 ч), 4 – гипоксия (2 % O₂, 20 ч) + препараты (20 ч). *p < 0,05

моксии. Однако, в условиях гипоксии отмечено, что в группах 2 и 4, вероятно, присутствие цефтриаксона препятствует увеличению данного параметра и поддерживает его на уровне нормоксии. Это может свидетельствовать о том, что цефтриаксон препятствует функциональным изменениям цитоплазматической мембраны астроцитов при недостатке кислорода.

Выявление механизмов реакции клетки на недостаток кислорода имеет особое значение для понимания развития патологических процессов, происходящих в организме. Достижением последнего десятилетия явилась расшифровка молекулярных механизмов гомеостаза кислорода. Важнейшая роль в этих процессах принадлежит протеиновому комплексу, обладающему транскрипционной активностью - гипоксией индуцированному фактору Hif-1 [1–3, 7]. Анализ данных литературы подтверждает важность изучения механизмов регуляции Hif-1a для понимания развития ряда заболеваний нервной системы и поиска новых стратегий их лечения. В связи с этим нами проведены исследования по определению уровня экспрессии гена Hif-1a при реализации протективного эффекта подобранных нами сочетаний лекарственных препаратов (гроприносин 80 мкг/мл + симвастатин 0,1 нг/мл (C⁻⁶) (рисунок).

Как видно из данных, представленных на рисунке, исследуемые препараты повышают содержание Hif1α в 1,9 раза при нормоксии (содержании кислорода 21 %), а также повышают содержание Hif1α в 1,6 раза при гипоксии (содержании кислорода 2 %). Это указывает на про-

Таблица 2. Влияние сочетаний препаратов на мембранный потенциал митохондрий, цитоплазматической мембраны и внутриклеточное содержание АФК в цитоплазме астроцитов в норме и при гипоксии

Группы	Потенциал мембраны митохондрий (нормоксия) I _{РЕ} /I _{FITC} (зонд JC-1)	Потенциал мембраны митохондрий (гипоксия)	Вязкость цитоплазматической мембраны (нормоксия)	Вязкость цитоплазматической мембраны (гипоксия)
1. Контроль	2,29 ± 0,09(2,26)	2,95 ± 0,23(3,01) (p = 0,02)	260,7 ± 36,2 (272,5)	174,0 ± 33,6(178) (p = 0,02)
2. Гр80-с6	2,69 ± 0,17(2,69) (p = 0,02)	3,22 ± 0,34(3,28)	236,7 ± 33,2(237)	191,0 ± 53,9 (178,5)
3. С6+цеф50	2,79 ± 0,80(2,42)	3,09 ± 0,51(3,08)	251,0 ± 66,8(239,0)	221,0 ± 16,5 (222,0)
4. Гр80+с6+цеф50	3,31 ± 0,33(3,36) (p = 0,02)	3,09 ± 0,68(3,42)	262,2 ± 38,4(266)	237,7 ± 82,8(241,0)

тективное действие изучаемых сочетаний препаратов в отношении этих клеток, подвергшихся гипоксии и повышению их устойчивости при стрессовом воздействии, свойственном для многих нейродегенеративных патологий.

Выводы

1. Условия гипоксии (20 часов) изменяют значение мембранного потенциала митохондриальной мембраны, вязкость цитоплазматической мембраны и экспрессию гена *Hif1 α* . Данные параметры могут быть использовать при изучении антигипоксических свойств лекарственных препаратов.

2. Сочетание препаратов (гроприносин 80 мкг/мл + симвастатин 0,1 нг/мл) повышает экспрессию гена *Hif1 α* , что приводит к запуску адаптивных реакций в астроцитах, культивированных как в норме, так и гипоксии.

Литература

1. Левина, А. А., Макешова А. Б., Мамукова Ю. И. и др. Регуляция гомеостаза кислорода. Фактор, индуцированный гипоксией (HIF) и его значение в гомеостазе кислорода // Педиатрия. – 2009 – Т. 87, № 4. – С. 92–97.

2. Мезен, Н. И., Сидорович Э. К., Лихачев С. А., Квачева З. Б., Лобанок Е. С., Волотовский И. Д. Транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией, (HIF-1), его биологическая роль и взаи-

действие с системами функционирования клетки в условиях нормы и патологии // Весці Нацыянальнай акадэміі Беларусі, серія біялагічных навук. – 2013. – № 4. – С. 116–123.

3. Серебровская, Т. В. Гипоксия-индуцибельный фактор: роль в патофизиологии дыхания / Т. В. Серебровская // Укр. пульмонолог. журн. – 2005. – № 3. – С. 77–81.

4. Полтавцева, Р. А., Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высш. шк., 1967. – 322 с.

5. Мезен, Н. И., Сидорович Э. К., Квачева З. Б., Пинчук С. В., Антонец Н. А. Изучение протективного эффекта некоторых препаратов и их сочетаний на культивируемые астроглиальные клетки в условиях воздействия гипоксии и реоксигенации, метаболического стресса (сообщение 1) // Военная медицина. – 2015. – № 2. – С. 53–57.

6. *Donnan, G. A. A New Road Map for Neuroprotection. The 2007 Feinberg Lecture // Stroke. – 2008. – Vol. 39. – P. 242.*

7. *Hubbi, M. E. Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors / M. E. Hubbi, G. L. Semenza // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2015. – Vol. 309, № 12. – P. 775–782.*

8. *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.*

9. *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. – Vol. 23, № 35. – P. 11104–11111.*