

Н.И. Мезен¹, Э.Б. Квачева², А.С. Федулов¹, Ю.Г. Илькевич², Ю.П. Лосев¹

ПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ ПОЛИДИСУЛЬФИДА ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ В КУЛЬТУРЕ АСТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Белорусский государственный медицинский университет¹,
ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ²

Изучен характер гипоксического повреждения астроцитов in vitro и установлен нейропротективный эффект производного многоатомных фенолов полидисульфида галловой кислоты (ПГК).

Гипоксия – ведущее звено механизмов повреждений нервной ткани, возникающих при многих патологиях нервной системы [5].

Важную роль в адаптационных реакциях, развивающихся в нервной ткани в ответ на гипоксическое повреждение, играют астроциты. Однако механизм их гипоксического повреждения до конца не ясен. Одним из существенных факторов сложной цепи метаболических нарушений, развивающихся в астроцитах при гипоксии, является активация свободнорадикального окисления липидов.

В этой связи актуальными являются исследования, направленные на создание эффективных ингибиторов свободнорадикального окисления — антиоксидантов.

Среди последних по своей антиокислительной активности выделяются многоатомные фенолы. Ранее нами показан защитный эффект производного многоатомных фенолов Т-3 при некоторых патологических состояниях ЦНС [3, 4].

Целью данного исследования явилось изучение протекторного действия нового производного многоатомных фенолов полидисульфида галловой кислоты (ПГК) [2] на астроциты, культивируемые в условиях гипоксии.

Материал и методы

Первичную культуру астроцитов получали по методу [6] в модификации Э.Б. Квачевой [1]. Для этого использовали головной мозг новорожденных крысят 1-2-недельного возраста. В эксперимент брали культуру 1-2 пассажного уровня на 4-5 сутки роста in vitro. В качестве ростовой среды использовали ДМЕМ с добавлением 10% сыворотки плодов коров, гентамицина (100 мкг/мл). Для субпассирования культур диссоциацию клеток осуществляли 0,25% раствором трипсина и 0,02% раствором версена в соотношении (1:4). При пересеве использовали посевную дозу 7×10^6 клеток/мл ростовой среды. Культуры выращивали в пластиковых культуральных флаконах (Costar).

Содержание астроцитов в культуре и их функциональную активность контролировали с помощью непрямого метода флуоресцирующих антител с использованием поликлональных антител к глиальному фибриллярному белку (ГФКБ) (Sigma, США). Для морфологического изучения культуры клетки фиксировали раствором Дюбоск-Бразиль-Бузна, окрашивали гемотоксилином Бемеера и 0,5% водным раствором эозина. Препараты анализировали в световом микроскопе «Biostar» (ФРГ) с увеличением 100-400. Пролиферативную активность клеток оценивали по плотности насыщения клеток

в монослое и их митотической активности. Для определения митотической активности подсчитывали в поле зрения микроскопа 3000-5000 клеток, выделяя среди них клетки в стадии деления и выражали в промиллях (%).

Ультраструктуру астроцитов изучали по общепринятой методике на клетках, фиксированных 2,5% глутаральдегидом и 1% OsO₄ в 0,1 М какодилатном буфере (рН 7,3), обезвоженных и спиртах возрастающей концентрации и заключенных в аралдит. Ультратонкие срезы анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-100-CX (Япония).

Гипоксическое воздействие на культуры осуществляли в герметичной камере с газовой смесью 95% азота и 5% углекислого газа при 37° С. Соединение ПГК вносили в ростовую среду в нетоксичной дозе 0,05 мкг/мл за 30 минут до помещения астроцитов в гипоксические условия. Контролем служили культуры астроцитов, которые инкубировали в течение соответствующего периода времени в условиях нормы. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с использованием t-критерия.

Результаты и обсуждение

Полученные нами культуры мозга новорожденных крыс состояли на 95% из ГФКБ – положительных клеток (рис.1 А). Культуры представлены протоплазматическими и фибриллярными астроцитами. 2-3% из всех представителей популяции – клетки мезенхимальной природы. Протоплазматические астроциты среди астроглиальных клеток преобладали. Они имели звездчатую, иногда несколько вытянутую форму, с разной длины цитоплазматическими отростками. Характерной особенностью их при обработке антисывороткой к ГФКБ является наличие равномерного специфического свечения тел и отростков. При ультраструктурном изучении их цитоплазма и ядра имели низкую электронную плотность. В цитоплазме содержалось небольшое количество глиофибрилл и рибосом. Эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи представлены короткими цистернами. Количество митохондрий, их размеры и форма варьировали в широких пределах (рис.2 А). Ядра протоплазматических астроцитов имели округлую или овальную форму, содержали равномерно диспергированный хроматин, в большинстве случаев 2-3 нуклеолонемных ядрышка. Фибриллярные астроциты сходны по форме с протоплазматическими, однако, имели меньшую площадь тела клетки, более крупные ядра и длинные дихотомически ветвящиеся отростки. Специфическое свечение в реакции на ГФКБ преобладало у

Таблица 1

Влияние соединения ПГК на морфо-функциональное состояние астроцитов, культивируемых в условиях гипоксии (20 часов) (n=4)

Исследуемые группы клеток	Статистические показатели	Морфофункциональные критерии	
		Гипертрофированные клетки, %	Митотическая активность, %
Контроль	M+m	1,6 ± 0,7	15,6 ± 3,4
Гипоксия	M+m	17 ± 1,0	6,3 ± 1,0
	P1-2	<0,001	<0,05
Гипоксия+ПГК (0,05 мкг/мл)	M+m	3,0 ± 1,0	11,0 ± 3,2
	P1-3	>0,5	>0,5
	P2-3	<0,05	<0,05

них вокруг ядер. При ультраструктурном исследовании отличительными признаками фибриллярных астроцитов было наличие мощных пучков глиофибрилл, часто начинающихся от перинуклеарной области цитоплазмы и идущих по периферии к отросткам. В их ядрах, как правило, содержалось не более 2-3 нуклеолонемных ядрышка.

Кроме того, в культурах наблюдали единичные более крупных размеров астроглиальные клетки (1,6%) (табл.1). Их цитоплазма содержала большое количество органелл (лизосом, митохондрий), липидных вакуолей. Митохондрии отличались большим полиморфизмом. Мы эти клетки отнесли к реактивным астроцитам. В культурах также встречались единичные клетки олигодендроглии. Они характеризовались удлинённой формой, небольшими размерами и содержали два длинных отростка, имеющих утолщения, крупное ядро, узкий ободок цитоплазмы. Митотическая активность интактных культур составляла 15,6 %.

Первые морфологические изменения в астроцитах наблюдались через 18 часов от начала гипоксического воздействия. Они характеризовались появлением отечных клеток (гипертрофированных и увеличенных в 1,5-8 раза в размерах астроцитов) с вакуолизацией их цитоплазмы, появлением многоядерных клеток (рис.1 Б). При этом снижался уровень митотической активности астроцитов, появлялись патологические формы митоза (неупорядоченное расположение хромосом в мета-и анафазе). Степень выраженности этих изменений усиливалась после 20-часовой гипоксии, вовлекая в поражение

ядра (просветление ядерного вещества, отсутствие ядрышек), появлении зоинофилии в цитоплазме. Поражение клеток имело очаговый характер. Целостность монослоя в эти сроки еще сохранялась. Поэтому этот временной интервал был выбран нами для оценки антигипоксических свойств соединения ПГК. Дальнейшая инкубация культур в гипоксической камере в течение 24 часов и более приводила к нарушению целостности монослоя с отторжением части клеток от поверхности флакона.

Электронно-микроскопический анализ астроцитов, подвергнутых 20-часовому воздействию гипоксии, выявил выраженные ультраструктурные изменения в ядре и цитоплазме. Так, большая часть ядерного хроматина была диспергирована, у внутреннего листка нуклеолеммы наблюдалась лишь его узкая конденсированная полоска. В ядре некоторых клеток имелись глыбки гетерохроматина, количество которых варьировало (рис. 2 Б, В). Среди органелл цитоплазмы наиболее характерные изменения были



Рис.1. Морфологические изменения клеток в астроцитарных культурах, подвергшихся гипоксическому воздействию (20 часов) и защитный эффект ПГК. Окраска гематоксилином и эозином, ув. х 200.

А – монослой клеток: 1 пассаж, 3 сутки роста in vitro (контроль)

Б-конгломераты многоядерных клеток при гипоксии

В – защитный эффект ПГК



Рис. 2. Электронограмма астроцитов в норме и при гипоксическом воздействии. Окраска уранилатом и цитратом свинца, ув.х 20000.

А – в норме (я-ядро с неконденсированным хроматином, м – митохондрии)

Б-20 часов гипоксии (цистерны ШЭР* расширены, деструкция митохондрий)

В – 20 часов гипоксии (в-в цитоплазме многочисленные вакуоли)

* (ШЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум)

☆ Новые технологии в медицине

отмечены в митохондриях. Часть из них, как и в контроле, была представлена изогнутыми филаментозными органеллами с сохранившимися мембранами, кристами и матриксом умеренной электронной плотности. В то же время наблюдались митохондрии с деструкцией крист и разреженным матриксом, число которых в некоторых клетках достигало 20-30% от общего количества. Часто в них находились небольшие скопления темных глобул диаметром 10-15 нм. Цистерны шероховатого эндоплазматического ретикула были несколько расширены (рис.2 Б).

Итак, полученные данные свидетельствуют о развитии адаптационных процессов и нарушении структуры и функции глиальных клеток в условиях гипоксии. Причем выраженность указанных выше изменений усугублялась в зависимости от увеличения длительности гипоксического воздействия. В итоге, гипоксия приводила к выраженным морфофункциональным изменениям, которые регистрировались на электроннооптическом и светооптическом уровне.

Внесение в культуральную среду перед помещением астроцитов в гипоксическую камеру соединения ПГК в дозе 0,05 мкг/мл приводило к существенному снижению выраженности нейродеструктивных процессов. В частности, количество отечных клеток уменьшалось, по сравнению с таковым без применения исследуемого вещества, в 5,3 раза. Митотическая активность астроцитов при этом сохранялась на уровне 11% (табл. 1, рис.1 В). Ультраструктура астроцитов под воздействием антиоксиданта ПГК оказалась сходной с таковой в интактных культурах, а именно: митохондрии астроцитов оставались в хорошей сохранности, цистерны шероховатого эндоплазматического ретикула не расширены, ядра содержали деконденсированный хроматин.

На основании представленных выше данных можно, следовательно, предположить, что антиоксидант ПГК и способствует предупреждению обусловленных гипоксией структурнофункциональных нарушений астроцитов.

Таким образом, полученные предварительные результаты свидетельствуют о способности антиоксиданта ПГК эффективно защищать астроциты от ги-

поксического повреждения и создают перспективу его использования при гипоксии нервной ткани.

Выводы

1. Разработана модель гипоксического повреждения нейроглиальных клеток *in vitro*, позволяющая изучать механизмы их гипоксического повреждения и проводить быстрый предварительный и достаточный экономичный скрининг нейропротекторных препаратов.

2. Характерными признаками гипоксического повреждения астроцитов являются на ранних сроках (до 20 часов) локальная реактивация и гипертрофия клеток со структурными перестройками в клетках, снижением митотической активности, формированием многоядерных клеток, после 20 часов гипоксического воздействия – вакуолизация цитоплазмы, деструкция клеточных органелл (в большей степени митохондрий), в последующие сроки (24 часа и более) – тотальная цитодеструкция.

3. Соединение ПГК, относящееся к антиоксидантам из группы многоатомных фенолов, обладает выраженными протекторными свойствами по отношению к культивируемым в условиях гипоксии астроцитам, снижая его повреждающее действие на клетки.

Литература

1. Э.Б. Квачева, М.К. Недзведь, П.Г. Рытик и др. Длительное культивирование клеток мозга человека и их морфологическое изучение. – Материалы I Всесоюзного симпозиума «Возбудимые клетки в культуре ткани». -Пушино, 1984, С.108-111.
2. Ю.П. Лосев, А.С.Федулов, Н.И. Мезен. Ингибиторы перекисного окисления липидов с внутримолекулярным синергизмом. – Доклады Национальной академии наук Беларуси 1999, т.3, №3, С.59-61.
3. Мезен Н.И., Федулов А.С., Квачева Э.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.
4. Мезен Н.И., Квачева Э.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.
5. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические аспекты. Под редакцией Л.Д. Лукьяновой, И.Б. Ушанова. М., 2004, С.112-138.
6. Boocher, M. Sensenbrenner. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flasc cultures. – Neurobiol., 1972, v.2, p.97-105.