

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ЦЕРЕБРАЛА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК ФЕОХРОМОЦИТОМЫ КРЫСЫ

Поступила 18.03.10

Исследовали влияния недавно предложенного органолептического препарата церебрала, эффективно при ряде сосудистых патологий головного мозга, на культуру клеток феохромоцитомы крысы РС-12. Через 24 ч после пассирования нормальная среда культивирования в шести группах культур из семи заменялась аналогичными средами с добавлением 0.2 и 2.0 мг/мл церебрала, 400 нг/мл фактора роста нервных клеток (NGF), 1.0 мкМ блокатора высокопороговых кальциевых каналов верапамила или комбинаций 0.2 и 2.0 мг/мл церебрала с 1.0 мкМ верапамила. На протяжении шести суток тест-периода измеряли средние значения плотности культивируемых клеток, относительные количества единиц, обладающих выраженными отростками, и проективную площадь тел клеток; согласно последнему показателю рассчитывали условные диаметры клеток – диаметры круга, равновеликого их проективной площади. Выращивание клеток РС-12 в контрольных условиях не сопровождалось трансформацией их подавляющего большинства в нейроноподобные единицы. Воздействие церебрала в обеих использованных концентрациях обуславливало существенное подавление процесса пролиферации таких клеток, усиление формирования отростков, часть которых имели типичную для нейритов структуру, и увеличение размеров клеток. В условиях действия NGF наблюдались аналогичные эффекты, но они были заметно более интенсивными. Проявления клеточной дифференцировки под влиянием церебрала развивались с несколько большей задержкой и сглаживались раньше, чем эффекты действия NGF. Введение в среду культивирования 1.0 мкМ верапамила содействовало процессу клеточной дифференцировки; наблюдаемые эффекты были сопоставимы с результатами воздействия церебрала. Комбинации верапамила с церебралом в обеих использованных концентрациях обеспечивали несколько более интенсивные модулирующие воздействия на клетки РС-12, чем изолированные аппликации церебрала, но эффекты не были аддитивными. Обсуждаются возможные механизмы изменений морфологических характеристик клеток РС-12 под влиянием церебрала и зависимость таких изменений от состояния системы кальциевой сигнализации. Полученные данные согласуются с предположением о том, что действующие начала церебрала являются трофинотропинами, иницирующими и/или усиливающими синтез NGF.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: феохромоцитома РС-12, дифференцировка, пролиферация, церебрал, фактор роста нервных клеток (NGF), верапамил.

ВВЕДЕНИЕ

Поражения сосудистой системы головного мозга (в частности, инсульты различного генеза) представляют собой исключительно опасные заболевания. Ишемические инсульты более часты (их относи-

тельное количество достигает 80–90 %); геморрагические инсульты встречаются значительно реже, но они более опасны (смертность при этом виде заболеваний заметно выше) [1, 2]. Риск церебрального инсульта существует почти во всех возрастных категориях. Эффективность современных методов лечения геморрагических инсультов недостаточно высока, и это заболевание, как правило, сопровождается последующей инвалидизацией. Поиск лекарственных средств, проявляющих нейропротек-

¹ Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

² Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко (Украина).

Эл. почта: neu_nei@yahoo.com (Д. А. Василенко)

alexandermakarenko@gmail.com (А. Н. Макаренко).

торные свойства и способствующих повышению выживаемости пациентов и снижению частоты и степени их инвалидизации в постинсультный период, исключительно актуален.

В качестве одного из таких средств был предложен органопрепарат церебрал («Днепрофарм», Украина). Этот препарат представляет собой очищенную смесь пептидов и аминокислот, образующихся в мозгу животных в условиях индукции острого аутогеморрагического инсульта. Результаты клинических испытаний показали, что церебрал дает положительный терапевтический эффект при ряде патологий мозговых сосудов, в том числе и при геморрагическом инсульте. Наиболее активными действующими компонентами препарата, обеспечивающими такое влияние, вероятно, являются пептиды, молекулы которых состоят из трех – двенадцати аминокислотных остатков. Высказано предположение, что подобные пептиды функционируют как регуляторы продукции фактора роста нервных клеток (NGF). Последний, как известно, постоянно присутствует в мозгу животных и человека (особенно на ранних стадиях онтогенетического развития); в случаях повреждений тканей мозга продукция NGF существенно возрастает. Было показано, что введение церебрала в условиях экспериментального геморрагического инсульта приводило к повышению интенсивности синтеза и секреции NGF. Вместе с тем церебрал практически не влиял на синтез и секрецию данного ростового фактора у интактных животных; иными словами, действующие начала церебрала, видимо, являются достаточно специфическими трофинотропинами [3].

Известно, что под действием NGF и ряда других факторов морфологическая дифференцировка незрелых нервных и нейроноподобных клеток в условиях их культивирования индуцируется и/или усиливается. Это выражается в замедлении или остановке процесса пролиферации подобных клеток и усилении формирования отростков (нейритов). Есть основания полагать, что данные процессы кальцийзависимы [4–9].

С учетом сказанного выше мы исследовали влияние церебрала на культивируемые клетки феохромоцитомы крысы РС-12. Клетки данной линии происходят от клеток кортикального слоя надпочечников; они обладают рядом свойств, приближающих их к нейронам, и способны в определенных условиях трансформироваться в нейроноподобные клеточные единицы. Клетки РС-12 широко исполь-

зуются в экспериментах, направленных на выяснение механизмов процессов клеточного роста и дифференцировки.

Мы сопоставляли влияния церебрала, который добавляли в среду культивирования в двух концентрациях, различающихся на порядок, с эффектами агента, в отношении которого церебрал, возможно, реализует свое регулирующее действие, т. е. NGF как такового. Анализировались также влияния, которые оказывает на культуру клеток РС-12 верапамил – блокатор кальциевых каналов L-типа. Кроме того, исследовались эффекты комбинированного действия церебрала и верапамила. Мы полагали, что полученные данные будут способствовать выяснению механизмов действия церебрала на процессы пролиферации и дифференцировки нейроноподобных клеточных элементов. Это, в свою очередь, может приблизить нас к пониманию механизмов терапевтического действия церебрала в условиях инсультного поражения мозга.

МЕТОДИКА

Опыты были проведены на клетках феохромоцитомы крысы линии РС-12, культура которых длительное время поддерживается в Институте физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины. Общая длительность периода культивирования данных клеток в условиях настоящего эксперимента составляла семь суток. Образцы культуры в виде суспензии в нормальной среде (85 % RPMI-1640, 10 % термоинактивированной лошадиной сыворотки и 5 % эмбриональной телячьей сыворотки с добавлением 400 мкг/мл гентамицина; все компоненты производства «Sigma», США) пассировали в пластиковые флаконы Карреля, которые находились при 37 °С в атмосфере увлажненного воздуха, обогащенного CO₂ до 5 %. Через 6–9 ч производилось измерение исходных морфометрических характеристик клеток, прикрепившихся к субстрату. Для этого участки культуры фотографировали с использованием инвертированного фазово-контрастного микроскопа. Через 24 ч после пассирования, т. е. в конце лаг-периода, среду культивирования в шести исследуемых группах из семи (за исключением контрольной группы 1) заменяли модифицированными средами, содержащими в себе тест-агенты. В группе 1 среда после замены сохраняла исходный состав. В группах 2 и 3 к аналогичной среде добавляли 0.2 и 2.0 мг/мл церебрала («Дне-

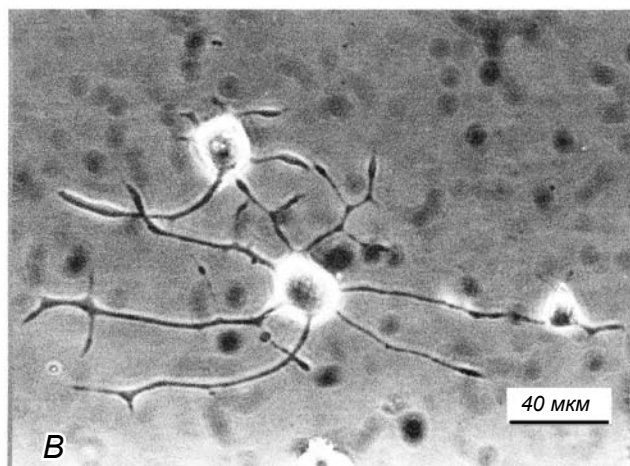
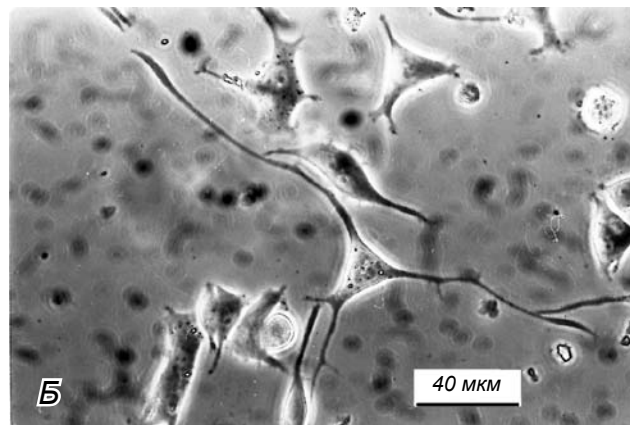
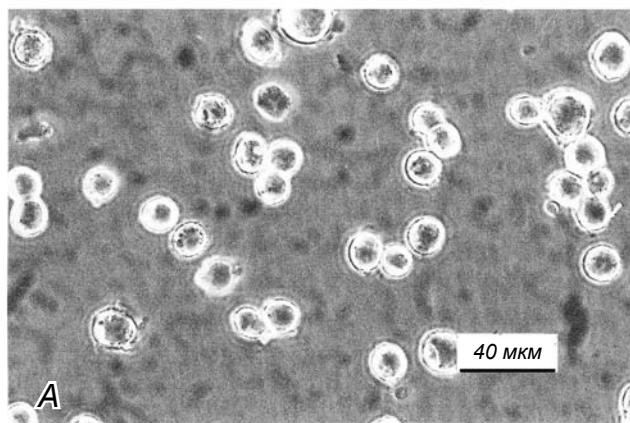
профарм», Украина) соответственно. Культивирование клеток группы 4 производилось в среде, содержащей в себе 400 нг/мл NGF («Sigma», США), группы 5 – 1.0 мкМ верапамила («Дарница», Украина). Наконец, клетки групп 6 и 7 подвергали комбинированному действию 0.2 и 2.0 мг/мл церебрала + 1.0 мкМ верапамила соответственно.

После замены сред (т. е. на второй день культивирования) исследуемые образцы культур вновь фотографировали, и эта процедура повторялась каждые 24 ч вплоть до конца шестидневного тест-периода. На полученных фотоизображениях измеряли плотность культивируемых клеток (их количество на 1 мм² субстрата), относительное количество клеток, обладающих выраженными отростками, и проективную площадь тел клеток (последний параметр – с использованием полуавтоматического анализатора изображений).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пролиферативная активность исследуемых клеток характеризовалась соответственно изменениям плотности их локализации на поверхности прикрепления в различные сроки культивирования. Поскольку вариабельность указанного параметра на различных участках данных поверхностей была заметной, рассчитывали средние величины плотности для каждой группы. Для этого на фотоизображениях культур измеряли количества клеток в пределах нескольких (до 15) случайно выбранных квадратных тест-участков 400 × 400 мкм², после чего полученные значения пересчитывали на площадь 1 мм². Исходные усредненные значения плотности клеток, измеренные через 6–9 ч после их пассирования, в разных группах составляли от 73 ± 6 до 105 ± 7 мм⁻². Для более объективной характеристики процесса пролиферации в этих группах мы использовали не натуральные, а нормированные величины данного параметра, принимая упомянутые исходные значения в каждой группе за 100 %.

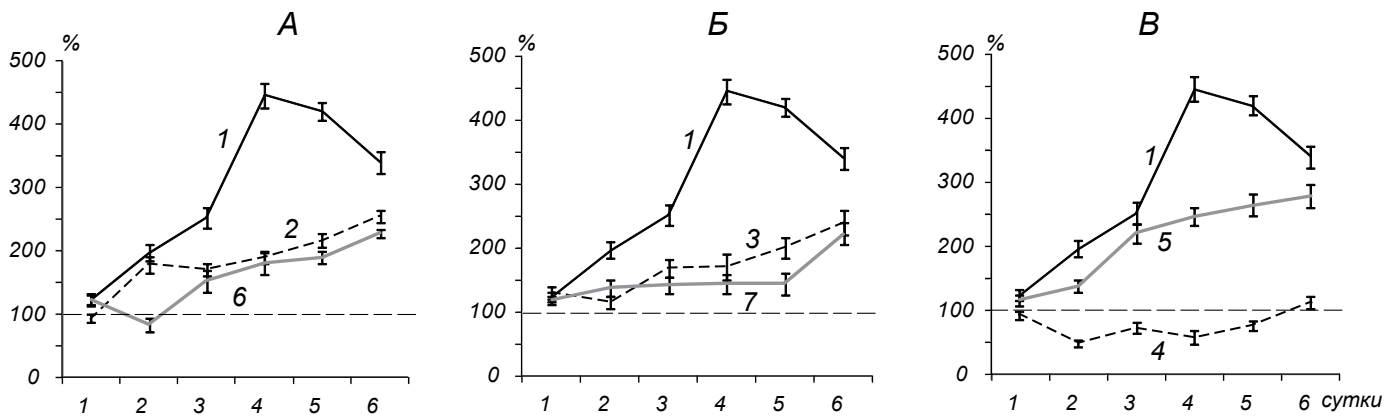
После 24 ч культивирования, т. е. в начале тест-периода, средняя нормированная плотность клеток в различных группах варьировала от 130 до 94 % относительно исходных величин. Различия между исходными значениями плотности и упомянутыми величинами в каждой группе в большинстве случаев не достигали уровня достоверности. Межгрупповое сравнение плотностей, измеренных в начале тест-периода, также не показало наличия досто-



Р и с. 1. Примеры микрофотографий клеток феохромоцитомы в разные сроки культивирования в различных условиях.

А – клетки в первый день культивирования (7 ч после пассирования) в нормальной среде; *Б* – на третий день тест-периода в присутствии 2.0 м г/мл церебрала (группа 3); *В* – на третий день тест-периода в присутствии 400 нг/мл NGF (группа 4).

Р и с. 1. Приклади мікрофотографій клітин феохромоцитоми у різні терміни культивування у відмінних умовах.



Р и с. 2. Динамика пролиферативной активности клеток РС-12 в различных условиях культивирования.

A–B – графики изменений нормированных средних значений плотности клеток на субстрате (ось ординат, %) в течение тест-периода (ось абсцисс, сутки); указаны также значения ошибок среднего. За 100 % во всех случаях приняты значения плотности клеток (мм^{-2}) в различных группах до замены нормальной среды средами, содержащими в себе тест-агенты. Группа 1 – контроль, 2–7 – культивирование в присутствии 0.2 и 2.0 мг/мл церебрала (2 и 3 соответственно), 400 нг/мл NGF (4), 1.0 мкМ верапамила (5) и комбинаций 0.2 и 2.0 мг/мл церебрала с 1.0 мкМ верапамила (6 и 7 соответственно).

Р и с. 2. Динаміка проліферативної активності клітин РС-12 у різних умовах культивування.

верных различий (рис. 2, *A–B*). На протяжении первого–третьего дней тест-периода (т. е. второго–четвертого дней культивирования) плотность клеток РС-12 в контрольной группе 1 увеличивалась примерно в 4.5 раза. На четвертый день данный параметр сохранял значение, достаточно близкое к указанному выше. В конце периода культивирования плотность клеток в группе контроля заметно уменьшалась, однако при этом она более чем втрое превышала исходное значение (*A–B*).

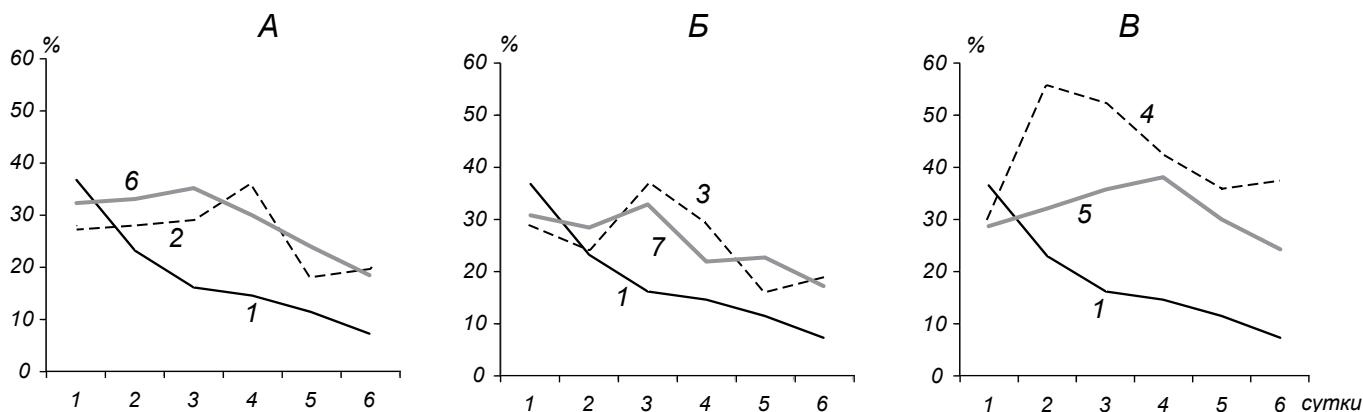
Культивирование клеток РС-12 в среде, содержащей в себе 0.2 мг/мл церебрала (группа 2), обуславливало значительное (в пределах четвертого–шестого дней тест-периода – высокодостоверное) подавление пролиферативной активности. На протяжении второго–четвертого дней тест-периода плотность единиц оставалась почти постоянной, составляя в среднем 179–190 % исходного значения. После этого данный параметр начинал медленно возрастать, и в последний (шестой) день культивирования плотность достигала 255 % начальной величины (рис. 2, *A*).

Добавление к культуральной среде церебрала в большем количестве (2.0 мг/мл; группа 3) обуславливало еще более сильное подавление пролиферативной активности клеток РС-12. На третий день тест-периода плотность клеток превышала исходное значение менее чем на 40 %, и примерно такой же уровень данного параметра сохранялся на чет-

вертый день. Лишь на шестой день среднее значение плотности несколько возрастало, достигая 240 % исходного (рис. 2, *B*).

Введение в среду культивирования 400 нг/мл NGF в группе 4 практически полностью подавляло пролиферативную активность культивируемых клеток РС-12. На вторые сутки после начала воздействия указанного фактора плотность клеток не только не возрастала; она уменьшалась более чем вдвое (в среднем до 49 % исходного значения). На протяжении последующих трех дней культивирования указанный параметр сохранялся на уровне ниже исходного (58–76 %). Только на шестой день значение средней плотности клеток РС-12 превышало начальную величину, однако лишь на 13 % (рис. 2, *B*).

Добавление к среде 1.0 мкМ верапамила (группа 5) в целом приводило к некоторому снижению пролиферативной активности по сравнению с контролем, но оно было далеко не полным, как в случае действия NGF. На второй день тест-периода плотность клеток РС-12 по сравнению с исходной почти не увеличилась; затем этот параметр начинал возрастать, но заметно менее интенсивно, чем в контрольной группе 1. На шестой день плотность клеток превышала начальное значение примерно в 2.8 раза. При этом снижения плотности на пятый–шестой дни тест-периода культивирования (что было характерно для контрольной группы 1) в группе 5 не наблюдалось (рис. 2, *B*).



Р и с. 3. Динамика относительных количеств (%) клеток РС-12, обладающих хорошо выраженными отростками, в течение тест-периода (сутки).

Обозначения групп те же, что и на рис. 2.

Р и с. 3. Динаміка відносних кількостей (%) клітин РС-12 з добре вираженими відростками впродовж тест-періоду (доби).

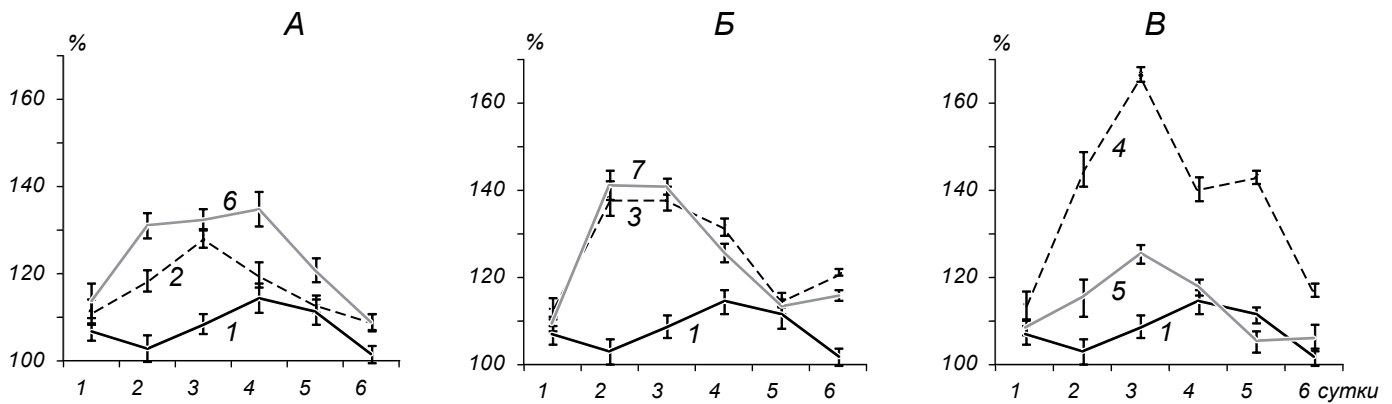
Комбинированное воздействие церебрала и верапамила на культуру клеток РС-12 в целом обуславливало несколько более интенсивные эффекты подавления пролиферации, чем изолированное влияние церебрала в обеих тестируемых дозах. Оба графика, отражающих динамику влияний 0.2 и 2.0 мг/мл церебрала + 1.0 мкМ верапамила (группы 6 и 7), располагались в основном ниже кривых, соответствующих эффектам изолированного добавления церебрала в указанных дозах (группы 2 и 3; рис. 2, А, Б), хотя различия между соответственными значениями в те или иные дни наблюдения были в основном недостоверными. Таким образом, в общем можно прийти к заключению, что верапамил в дозе 1.0 мкМ в некоторой степени потенцирует антипролиферативные эффекты церебрала.

Динамика количества клеток, обладающих отростками. Перед началом культивирования клетки РС-12, находясь в суспензии, выглядели шарообразными или эллипсоидальными. Через 6–9 ч после пассирования клетки, осевшие на субстрат, в большинстве сохраняли подобную форму (рис. 1, А). Однако через 24 ч такие клетки, прикрепившиеся к субстрату, достаточно часто проявляли первичные признаки морфологической дифференцировки. Подобные единицы распластывались по субстрату, их тела приобретали полигональную форму, и цитоплазма многих из них формировала выступы, соизмеримые по длине с размером тела клетки или превышающие его. Подобные образования, не имеющие типичной нейритоподобной структуры, обычно квалифицируются как псевдоотростки [7–9]. В

дальнейшем относительное количество клеток, которые обладали такими отростками, в контрольной группе 1 прогрессивно уменьшалось, а доля клеток сфероидной или эллипсоидальной формы возрастала. В первый день тест-периода среди клеток контрольной группы 1 единицы, обладающие выраженными отростками, составляли более трети; в конце же упомянутого периода их количество лишь несколько превышало 7 % (рис. 3, А–В).

Тест-культивирование клеток РС-12 в средах, которые содержали в себе факторы, способствующие процессу клеточной дифференцировки, обуславливало существенное усиление образования отростков. У многих клеток такие отростки имели значительную длину и приобретали нейритоподобную форму. В части случаев на них наблюдались ветвления второго, а у небольшой части клеток (обычно менее 1–0.5 %) – даже третьего порядка (рис. 1, Б, В). У других единиц характеристики цитоплазматических выступов (даже тех, которые имели довольно значительную длину) соответствовали таковым псевдоотростков (Б). Многие же клетки вообще были лишены длинных отростков и сохраняли сглаженную полигональную или округлую форму. Подобная гетерогенность наблюдаемой картины заставила нас при подсчете соответствующих групп клеток учитывать все единицы, у которых длина отростков превышала размеры клеточного тела, независимо от того, были такие отростки подобны нейритам или нет.

В различных экспериментальных группах относительные количества клеток, обладающих отрост-



Р и с. 4. Динамика нормированных средних значений (%) условного диаметра ($D_{\text{усл}}$) тел клеток РС-12 в течение тест-периода. За 100 % во всех случаях приняты значения средних $D_{\text{усл}}$ в разных группах до замены сред (перед началом действия тест-агентов). Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

Р и с. 4. Динаміка нормованих середніх значень (%) умовного діаметра тіл клітин РС-12 впродовж тест-періоду.

ками, в первый день тест-периода (т. е. после замены нормальной среды тест-средами) варьировали от 32.2 до 27.8 %. Иначе говоря, они были вполне сопоставимы с соответствующими значениями в группе 1. В группе 2, подвергнутой воздействию церебрала в концентрации 0.2 мг/мл, доля клеток с отростками поддерживалась примерно постоянной до третьего дня тест-периода. На четвертый день этого периода количество клеток с отростками возросло до 36.1 %. Затем количество клеток группы 2, имевших отростки, заметно уменьшалось (рис. 3, А). Динамика количества подобных клеток в группе 3, в которой в среду культивирования добавляли 2.0 мг/мл церебрала, демонстрировала определенное сходство с описанной выше с той разницей, что достаточно резкое (до 37.2 %) увеличение количества единиц, обладавших отростками, происходило раньше – на третий день тест-периода (В).

В культуре, находящейся в среде, которая содержала в себе NGF (группа 4), резкое увеличение числа клеток, обладавших отростками, происходило уже через одни сутки после начала действия данного фактора. В этой группе относительное количество таких единиц на протяжении второго-третьего дней тест-периода превышало 50 %. Затем данный показатель заметно уменьшался, но даже в конце периода культивирования более трети наблюдаемых клеток имели отростки значительной длины (рис. 3, В). Воздействие 1.0 мкМ верапамила (группа 5) также обуславливало существенное увеличение количества культивируемых клеток, обладающих отростками. Однако данный эффект был не столь интенсивным, как в условиях влияния NGF, и

максимум достигался лишь на четвертые сутки после смены среды. К концу тест-периода упомянутый показатель заметно падал, но продолжал значительно превышать таковой в контрольной группе 1 (В).

В условиях культивирования в среде, содержащей в себе комбинацию 0.2 мг/мл церебрала с верапамилом (группа 6), количество клеток с отростками на протяжении первых двух дней тест-периода несколько превышало аналогичный показатель в условиях изолированного действия церебрала в указанной концентрации. Позднее подобной разницы в общем не наблюдалось (рис. 3, А). Если же верапамил добавлялся к 2.0 мг/мл церебрала (группа 7), превышения количества клеток с отростками по сравнению с соответствующим показателем при изолированном действии церебрала в указанной концентрации не отмечалось (В).

Динамика размеров клеток РС-12. Как упоминалось в Методике, непосредственно измеряемым параметром, характеризующим размеры культивируемых клеток, была проективная площадь их тел. При измерении данного показателя из рассмотрения исключались отростки, толщина которых была менее 0.2–0.15 размера тела клетки. Метод измерения проективной площади клеточной единицы, широко используемый в морфометрических исследованиях и применявшийся в нашей лаборатории ранее [7–9], позволяет достаточно объективно характеризовать величины двумерных объектов сложной геометрической формы. Тем не менее он не вполне удобен, поскольку получаемые значения пропорциональны квадрату линейных размеров объекта. По-

пытки же непосредственно определять линейные размеры (например, диаметры аппроксимирующего эллипса, периметр профиля), как правило, не позволяют обеспечить удовлетворительную точность. Поэтому в настоящей работе мы использовали подход, применявшийся ранее, – вычисление условного диаметра ($D_{\text{усл}}$) тела рассматриваемой единицы, т. е. диаметра круга, равновеликого измеренной проективной площади. Такой прием позволяет свести характеристики линейных размеров объектов сложной формы к единственному параметру, хотя и условному, что существенно упрощает статистическую обработку. Подобный метод весьма прост и в то же время продемонстрировал свою достаточно высокую валидность [10]. Значения $D_{\text{усл}}$, рассчитанные соответственно значениям проективных площадей, в первый день культивирования (через 6–9 ч после пассирования) составляли в различных группах от 20.8 ± 0.4 до 22.0 ± 0.3 мкм. Эти величины в каждом случае принимали за 100 %, и динамика размеров культивируемых клеток, соответственно, характеризовалась изменениями нормированных средних значений $D_{\text{усл}}$.

В первый день тест-периода средние значения $D_{\text{усл}}$ тел клеток РС-12 различных групп варьировали от 106.7 до 113.9 % исходных величин. Напомним, что в первый день указанного периода клетки, прикрепившиеся к субстрату, распластывались по нему (т. е. уплощались), причем многие из них обладали псевдоотростками. Проективная площадь последних при измерениях не учитывалась. В контрольной группе 1 средний $D_{\text{усл}}$, несущественно уменьшившийся на второй день, в течение двух последующих суток возрастал (до 114.4 % исходного; различие недостоверно, $P > 0.05$), а к концу периода культивирования практически возвращался к начальному значению (рис. 4). В группе 2 при действии церебрала в концентрации 0.2 мг/мл средний $D_{\text{усл}}$ клеток на третий день тест-периода значимо ($P < 0.05$) увеличивался, составляя 128.2 % исходного, после чего следовало падение этого параметра (А). Добавление к среде 2.0 мг/мл церебрала обусловливало в группе 3 весьма значительное возрастание размеров исследуемых клеток (средний $D_{\text{усл}}$ достигал 138.0 %; $P < 0.01$) уже на второй день тест-периода. Практически то же значение сохранялось и на третий день, но затем, как и в группе 2, значения $D_{\text{усл}}$ уменьшались (Б).

Воздействие NGF приводило к быстрому и очень существенному увеличению $D_{\text{усл}}$ культивируемых клеток РС-12 в течение первых трех дней тест-

периода. Средняя величина данного параметра на третий день достигала 166.4 % исходной (это отражало увеличение среднего значения проективной площади почти в 2.8 раза). Затем такое увеличение сменялось достаточно быстрым падением. В конце периода культивирования средний $D_{\text{усл}}$ клеток группы 5, однако, все еще превышал исходную величину почти на 20 %. Воздействие 1.0 мкМ верапамила (группа 5) приводило к не очень значительному (примерно на 25 %) увеличению $D_{\text{усл}}$ клеток РС-12 на третий день тест-периода, после чего этот показатель уменьшался (рис. 4, В).

Если к церебралу в концентрации 0.2 мг/мл добавляли 1.0 мкМ верапамила (группа 6), последний агент заметно усиливал влияние церебрала, обуславливая более значительное увеличение размеров культивируемых клеток. На второй и четвертый дни тест-периода разница между эффектами изолированного действия 0.2 мг/мл церебрала и комбинации последнего с верапамилом была достоверной (рис. 4, А). Добавление же верапамила к 2.0 мг/мл церебрала практически не изменяло влияния последнего на размеры культивируемых клеток. Соответствующие графики были очень близки друг к другу, и значения $D_{\text{усл}}$ во все дни тест-периода не отличались значимо от аналогичных величин в условиях изолированного действия церебрала в упомянутой высокой дозе (Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в нашей работе данные можно резюмировать следующим образом. Культивирование клеток феохромоцитомы линии РС-12 в контрольных условиях (с использованием одной из модификаций стандартной методики [11]) сопровождалось весьма интенсивной пролиферацией примерно до пятого дня тест-периода, после чего этот процесс заметно подавлялся. Значительная часть (более трети) контрольных клеток после завершения лаг-периода и прикрепления к субстрату имели хорошо выраженные отростки. Структура последних, однако, соответствовала структуре так называемых псевдоотростков (несмотря на то, что у небольшой части из них даже могли иметься ветвления второго порядка). В ходе культивирования в контрольных условиях типичные нейритоподобные отростки у клеток РС-12 за редчайшими исключениями не развивались. Относительное количество единиц, обладающих отростками, к концу

периода культивирования уменьшалось примерно в пять раз. Следует полагать, что во всяком случае частично это обуславливалось ретракцией отростков. Размеры клеточных тел исследуемых единиц контрольной группы в ходе культивирования изменялись сравнительно слабо. Таким образом, выращивание клеток РС-12 в контрольных условиях не сопровождалось дифференцировкой подавляющего большинства этих клеток и их трансформацией в нейроноподобные единицы (хотя какая-то часть данных клеток сохраняли признаки первичной дифференцировки и в конце тест-периода).

Добавление к среде культивирования 400 нг/мл NGF полностью подавляло пролиферацию клеток РС-12 и весьма быстро вызывало интенсивное образование отростков у таких клеток. Относительное количество клеток, обладающих отростками значительной длины, на второй-третий дни тест-периода в условиях воздействия NGF превышало 50 %. У многих подобных клеток отростки по своим морфологическим характеристикам полностью соответствовали нейритам. Их длина значительно превышала размеры тел клеток, а часть таких отростков обладали ветвлениями второго и даже третьего порядков. Вместе с тем у другой части клеток NGF-группы 4 морфологические особенности отростков (значительная относительная толщина, нечеткая ограниченность от клеточного тела) соответствовали таковым псевдоотростков. У остальных же клеток псевдоотростки цитоплазмы были небольшими, а заметная часть клеток в условиях действия NGF сохраняли сферическую или эллипсоидную форму и вообще не имели отростков. Подобная гетерогенность наблюдаемых морфологических характеристик обусловила то обстоятельство, что в пределах экспериментальных групп 2–7 мы не дифференцировали клетки, имеющие или нейриты, или псевдоотростки, а подсчитывали лишь общее количество единиц, у которых отростки были выражены в достаточной степени (превышали размеры тела). Кроме того, мы в настоящей работе не анализировали подробно динамику длины отростков, понимая, что изменения данного показателя в значительной мере субъективны и подобные оценки будут весьма приблизительными. Наиболее вероятной основной причиной отмеченной гетерогенности морфологических характеристик клеток РС-12, у которых индуцировалась дифференцировка, является недостаточная степень синхронизации культуры в процессе ее выращивания, предшествующего пассированию и тестирова-

нию эффектов исследуемых агентов.

Другим отчетливым аспектом влияния NGF на культивируемые клетки РС-12 являлось значительное (в среднем более чем полторакратно) увеличение линейных размеров исследуемых единиц, отчетливо выраженное на протяжении почти всего тест-периода. Таким образом, наши данные полностью согласуются с полученными ранее многочисленными свидетельствами того, что NGF является мощным индуктором процесса клеточной дифференцировки [4, 5].

Церебрал в обеих исследованных тест-дозах значительно подавлял пролиферацию клеток РС-12 и существенно модифицировал кривые роста. После кратковременного этапа увеличения плотности клеток соответствующих групп на протяжении определенных отрезков тест-периода поддерживалась на более или менее постоянных уровнях, достоверно меньших, чем в контроле. Под воздействием церебрала формирование отростков заметно усиливалось (хотя и не в такой степени, как в условиях прямого влияния NGF). У известной части клеток РС-12, подвергнутых влиянию церебрала в обеих тестируемых концентрациях, отростки имели типичную нейритоподобную структуру (рис. 1, Б).

Влияние церебрала сказывалось и на размерах клеток соответствующих групп (их $D_{\text{усл}}$), причем отличия от контроля в пределах основной части тест-периода были достоверными. В действии церебрала проявлялась определенная зависимость от дозы. И подавление пролиферации, и стимуляция развития отростков, и увеличение размеров клеток РС-12 были заметно более значительными в случае более высокой концентрации данного препарата в среде культивирования (2.0 мг/мл).

Помимо меньшей интенсивности эффектов церебрала по сравнению с таковыми NGF, видимо, следует отметить их несколько большую ограниченность во времени. Эти эффекты проявлялись с более длительной задержкой относительно момента смены сред, а сглаживались в целом несколько раньше, чем проявления действия NGF.

Таким образом, результаты нашей работы вполне согласуются с представлениями о том, что эффекты церебрала, включающего в себя, очевидно, ряд трофинотропных факторов пептидной природы, в значительной степени основываются на усилении синтеза NGF под влиянием данного препарата. Очевидно, церебрал способен индуцировать повышение продукции NGF и проявление соответствующих феноменов не только *in vivo*, но и в услови-

ях культивирования клеточных линий, способных к дифференцировке и трансформации в нейроноподобные элементы (к таким линиям относятся и клетки РС-12).

В числе общепринятых критериев морфологической дифференцировки обычно упоминается триада признаков – угнетение митотической активности клеток, изменение их размеров и образование нейритов [4, 8]. Результаты настоящих экспериментов свидетельствуют о том, что в исследованной культуре процессы индуцированной дифференцировки протекали далеко не синхронизированно и однозначно и наблюдаемая в динамике морфологическая картина характеризовалась существенной гетерогенностью. Трансформация значительной части клеток РС-12 в нейроноподобные единицы происходила в определенных временных интервалах фактически параллельно с продолжающейся интенсивной пролиферацией, а динамика изменений размеров исследуемых единиц проявляла лишь отдаленное сходство с динамикой количества клеток, обладающих выраженными отростками. Среди последних далеко не все можно было рассматривать как соответствующие по своим характеристикам нейритам. Подобная гетерогенность морфологической картины и дивергенция процессов клеточного роста и дифференцировки были в общем достаточно отчетливо выражены и в других предыдущих исследованиях, проведенных на клетках феохромоцитомы крысы [8, 9, 12, 13] и в работах на ином объекте – клетках нейробластомы мыши N1E-115 [7], однако внимание на этом аспекте не всегда акцентировалось.

В наших экспериментах выявилась некоторая зависимость наблюдаемых эффектов церебрала от действия агента, влияющего на кальциевую сигнализацию, – блокатора высокопоровых кальциевых каналов верапамила. Процессы роста и дифференцировки клеток в высокой степени зависимы от уровня свободного кальция в их цитоплазме ($[Ca^{2+}]_i$), причем такая зависимость достаточно сложна [6, 8, 9, 14]. Сопоставление результатов различных исследований заставило прийти к выводу, что подавление процесса пролиферации и развитие клеточных отростков у клеток, способных к дифференцировке, обеспечиваются лишь в пределах достаточно узких диапазонов $[Ca^{2+}]_i$ [15]. Поэтому применение блокаторов кальциевых каналов в опытах на одних объектах стимулировало рост нейритов, тогда как на других объектах данный процесс в указанных условиях либо подавлялся, либо не испытывал из-

менений (см. [8, 9]). Предполагается, что сдвиги $[Ca^{2+}]_i$ могут тормозить либо активировать клеточную дифференцировку в зависимости от исходного значения названного показателя в тех или иных клетках. Кроме того, эффекты упомянутых блокаторов, естественно, зависят от их концентрации, а чувствительность клеток к данным агентам в ходе культивирования существенно изменяется.

В предыдущих работах, проведенных в нашей лаборатории, было показано, что воздействия блокаторов кальциевых каналов нифедипина и верапамила на клетки феохромоцитомы крысы и нейробластомы мыши могут приводить к весьма различным эффектам. В частности, было обнаружено, что верапамил в концентрации 1.0 мкМ существенно усиливал признаки морфологической дифференцировки клеток нейробластомы N1E-115, тогда как концентрация этого блокатора 0.01 мкМ была неэффективной, а 100 мкМ обуславливали существенное общее угнетение жизнедеятельности упомянутых клеток [7]. Результаты настоящих опытов на другом объекте (клетках феохромоцитомы РС-12) вполне согласуются с приведенными данными. Вполне сопоставимыми оказались и результаты ранее выполненных опытов на культуре клеток феохромоцитомы с использованием другого кальциевого блокатора – нифедипина [8].

В настоящих опытах верапамил в концентрации 1.0 мкМ в некоторой степени подавлял пролиферацию клеток РС-12 на протяжении тест-периода, поддерживал относительное количество клеток, обладающих отростками, на сравнительно постоянном уровне (более высоком, чем в контроле) и обеспечивал некоторое увеличение размеров исследуемых клеток на определенном отрезке упомянутого периода. Таким образом, можно заключить, что верапамил в указанной дозе в общем содействует процессу дифференцировки клеток РС-12, хотя и не в такой степени, как NGF. Эффекты верапамила были в целом сопоставимы по интенсивности с влияниями 0.2 мг/мл церебрала, но несколько слабее, чем эффекты последнего в более высокой концентрации.

Предполагается, что действие блокаторов кальциевых каналов в определенных концентрациях способно ограничивать избыточное поступление кальция в клетку и содействовать поддержанию неких значений $[Ca^{2+}]_i$, оптимальных для процесса дифференцировки [7, 8, 15]. Как показано, сам этот процесс усиливает экспрессию кальциевых каналов (в том числе и низкопоровых, LVA),

что должно приводить к увеличению $[Ca^{2+}]_i$, и может вывести данный показатель из оптимального диапазона [6–8, 15]. Воздействие блокаторов высокопороговых кальциевых каналов приводит к заметной модуляции не только высоко-, но и низкопороговых компонентов кальциевого тока; изменения данных компонентов на ранних этапах культивирования могут оказывать решающее воздействие на процесс дифференцировки [7, 8]. Таким образом, механизмы воздействия блокаторов кальциевых токов на процессы клеточного роста и дифференцировки весьма сложны, тем более что роли высоко- и низкопороговых кальциевых каналов и характер взаимоотношений активности этих каналов, уровня внутриклеточного кальция и состояния цитоскелета (т. е. ключевых факторов, влияющих на упомянутые процессы) на разных стадиях развития нейроноподобных клеток могут существенно различаться [4, 6, 12, 16].

Анализируя полученные нами данные, очевидно, следует подчеркнуть не только выявленную зависимость эффектов церебрала от модуляции поступления кальция в клетки РС-12, обусловленной влиянием блокатора кальциевых каналов, но и определенную ограниченность такой зависимости. Можно констатировать, что эффекты церебрала в обеих использованных концентрациях и верапамила в дозе 1.0 мкМ не были аддитивными. Уже упоминалось, что совместное действие указанных агентов несколько (обычно статистически недостоверно) усиливало антипролиферативную активность по сравнению с таковой при изолированном действии церебрала. В то же время подобная комбинация обуславливала повышение количества единиц, обладающих отростками, и некоторое увеличение размеров клеток РС-12 только в случае использования церебрала в меньшей концентрации (0.2 мг/мл). При более высокой дозе этого препарата верапамил уже не усиливал данных аспектов его действия.

*Н. Х. Погорела¹, Д. А. Василенко¹, О. М. Макаренко²,
С. І. Савосько²*

МОЖЛИВІ МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ ЦЕРЕБРАЛУ НА МОРФОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛІТИН ФЕОХРОМОЦИТОМИ ЩУРА

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,
Київ (Україна).

² Київський національний університет ім. Тараса Шевченка
(Україна).

Резюме

Досліджували впливи нещодавно запропонованого органопрепарату церебралу, ефективного при низці судинних патологій головного мозку, на культуру клітин феохромоцитоми щура РС-12. Через 24 год після пасирування нормальне середовище культивування в шести групах культур із семи замінювалось аналогічними середовищами з додаванням 0.2 та 2.0 мг/мл церебралу, 400 нг/мл фактора росту нервових клітин (NGF), 1.0 мкМ блокатора високопорогових кальцієвих каналів верапамілу і комбінацій 0.2 та 2.0 мг/мл церебралу з 1.0 мкМ верапамілу. Протягом шести діб тест-періоду вимірювали середні значення щільності культивованих клітин, відносні кількості одиниць, які мають виражені відростки, та площу тіл клітин; згідно з останнім показником розраховували умовні діаметри клітин – діаметри кола, рівновеликого їх проективній площі. Вирощування клітин РС-12 у контрольних умовах не супроводжувалося трансформацією їх переважної більшості в нейроноподібні одиниці. Дія церебралу в обох використаних концентраціях зумовлювала істотне пригнічення процесу проліферації таких клітин, посилення формування відростків, частина котрих мала типову для нейритів структуру, та збільшення розмірів клітин. В умовах дії NGF спостерігались аналогічні ефекти, але вони були помітно більш інтенсивними. Прояви клітинного диференціювання під впливом церебралу розвивалися з дещо більшою затримкою і згладжувалися раніше, ніж ефекти дії NGF. Уведення в середовище культивування 1.0 мкМ верапамілу сприяло процесу клітинного диференціювання; спостережувані ефекти були співставними з результатами дії церебралу. Комбінація верапамілу із церебралом в обох використаних концентраціях забезпечувала дещо інтенсивніші модулюючі дії на клітини РС-12, ніж ізольовані аплікації церебралу, проте ефекти не були адитивними. Обговорюються можливі механізми змін морфологічних характеристик клітин РС-12 під впливом церебралу і залежність таких змін від стану системи кальцієвої сигналізації. Отримані дані узгоджуються з припущенням про те, що діючі основи церебралу є трофінотропінами, що ініціюють та/або посилюють синтез NGF.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. И. Гузева, М. Л. Чухловина, Е. М. Мацукатова, “Иммунологические аспекты патогенеза геморрагических инсультов”, *Юбилейн. Х конф. по нейроиммунологии*, **2**, № 49, 223-297 (2001).
2. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия головного мозга*, Медицина, Москва (2001).
3. А. Н. Макаренко, И. Г. Васильева, “Нейроактивирующий механизм действия трофинотропина церебрала”, *Эксперим. и клин. фармакология*, **67**, № 4, 12-15 (2004).
4. J. D. Pollock, M. Krepnin, and B. Rudy, “Differential effects of NGF, FGF, EGF, cAMP and dexamethasone on neurite outgrowth and sodium channel expression in PC-12 cells,” *J. Neurosci.*, **10**, 2626-2637 (1990).
5. K. Tatsuuro, “Molecular and cellular mechanisms of neuronal degeneration caused by nerve growth factor

- deprivation approached through PC-12 cell culture,” *Prog. Neuropsychopharm. Biol. Psychiat.*, **16**, 95-106 (1992).
6. M. Nattson and S. Kater, “Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility,” *J. Neurosci. Res.*, **7**, 4034-4043 (1987).
 7. С. В. Вятченко-Карпинский, Н. Х. Погорелая, А. Е. Тохтуев, М. Б. Седова, “Влияние верапамила на морфологическую дифференцировку и низкопороговый кальциевый ток клеток нейробластомы мыши”, *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **27**, № 4, 261-267 (1995).
 8. А. М. Starikova, М. А. Chavanov, N. Ch. Pogorelaya, and P. G. Kostyuk, “Nifedipine-induced morphological differentiation of rat pheochromocytoma cells,” *Neuroscience*, **86**, No. 2, 611-617 (1998).
 9. А. М. Starikova, N. Ch. Pogorelaya, and P. G. Kostyuk, “Long-term depolarization changes morphological parameters of PC12 cells,” *Neuroscience*, **95**, No. 3, 923-926 (1999).
 10. Д. А. Василенко, Л. П. Войтенко, У. Вуттиг, М. Мюллер, “Сравнительные размеры проприоспинальных нейронов различных структурно-функциональных групп у кошки”, *Нейрофизиология*, **16**, № 2, 238-247 (1984).
 11. L. A. Greene and A. S. Tischler, “PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research,” *Adv. Cell. Neurobiol.*, **3**, 373-414 (1982).
 12. А. М. Старікова, Н. Х. Погорела, “Вплив тривалої деполаризації на морфологічні характеристики клітин феохромоцитоми щура”, *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **31**, № 2, 144-149 (1999).
 13. A. L. Hughes, L. Gollapudi, T. L. Sladek, et al., “Mediation of nerve growth factor-driven cell cycle arrest in PC12 cells by p53. Simultaneous differentiation and proliferation subsequent to p53 functional inactivation,” *J. Biol. Chem.*, **48**, No. 275, 37829-37837 (2000).
 14. M. Mattson, A. Taylor-Hurter, and S. Kater, “Neurite outgrowth in individual neurons of a neuronal population is differentially regulated by calcium and cyclic AMP,” *J. Neurosci.*, **8**, 1704-1711 (1988).
 15. F. A. Al-Mohanna, J. Cave, and S. R. Bolsover, “A narrow window of intracellular calcium concentration is optimal for neurite outgrowth in rat sensory neurons,” *Dev. Brain Res.*, **70**, 282-290 (1992).
 16. D. Vaudry, P. J. Stork, P. Lazarovici, et al., “Signaling pathways for PC12 cell differentiation” making the right connections,” *Science*, **5573**, No. 296, 1648-1649 (2002).