

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОК ГЛИОМЫ КРЫСЫ С-6 ПРИ ДЕЙСТВИИ МЕНАДИОНА

Т.А. Кулагова

Научный руководитель – Г.Н. Семенкова
Белорусский государственный университет

Известно, что менадион индуцирует образование супероксидных анион-радикалов в различных типах клеток, в том числе и в клетках мозга – астроцитах [1]. Поскольку астроциты при активации способны генерировать и другие активные формы кислорода (АФК), а также NO, представляет интерес исследование процессов образования таких активных интермедиатов в этих клетках. С целью выяснения природы свободно-радикальных продуктов, генерируемых астроцитами при действии менадиона, проведен сравнительный анализ люминол- и люцигенин-опосредованной хемилюминесценции клеток глиомы крысы (С-6).

Материалы и методы. В работе использовали перевиваемую линию клеток глиомы крысы С-6 (НИИ ЭМ МЗ РБ), люминол, люцигенин, менадион, супероксиддисмутазу, N-ацетилцистеин, РТЮ (2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидозалин-1-оксил-3-оксид) – производства «Sigma», США и среду Эрла (pH=7,4) собственного приготовления. Клетки С-6 культивировали в среде MEM или в сбалансированном солевом растворе Эрла. Генерацию супероксидных анион-радикалов в астроцитах индуцировали добавлением менадиона в различных концентрациях к анализируемой пробе, содержащей монослой или суспензию из $1 \cdot 10^6$ клеток. Свободные радикалы регистрировали методом хемилюминесценции (ХЛ) на биохемилюминетре БХЛ-1 при температуре 37 °С и pH 7,4 с использованием в качестве индикаторов свечения люминола и люцигенина в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

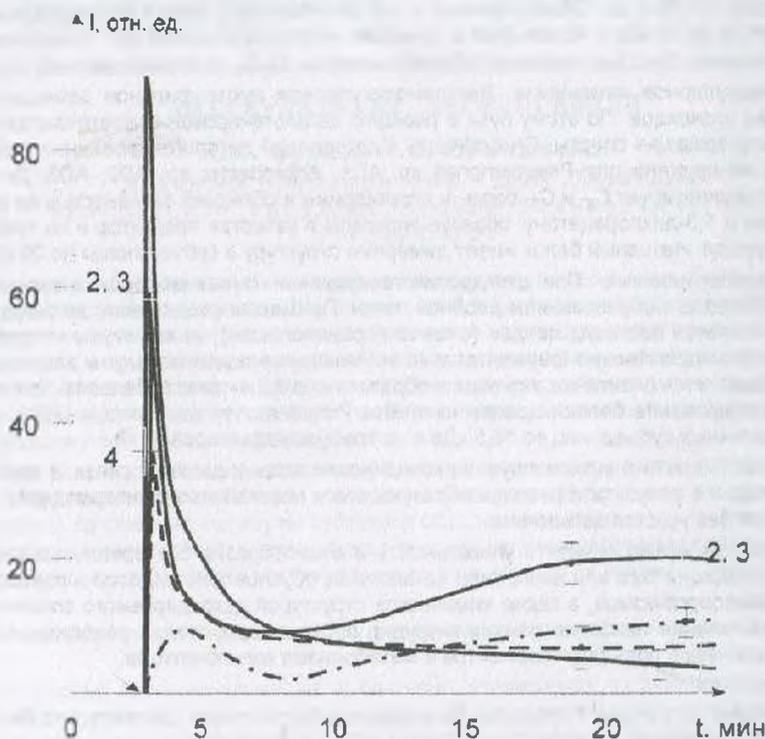


Рисунок 1 - Люминол-(1) и люцигенин-опосредованная (2) ХЛ перевиваемых клеток глиомы крысы при действии $1,62 \cdot 10^{-5}$ моль/л менадиона в присутствии $3 \cdot 10^{-5}$ моль/л РТЮ (3) $12,5$ мкг/мл СОД (4) и $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л N-ацетилцистеина (5). Концентрация люцигенина и люминола – $1,25 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Стрелкой указан момент добавления менадиона.

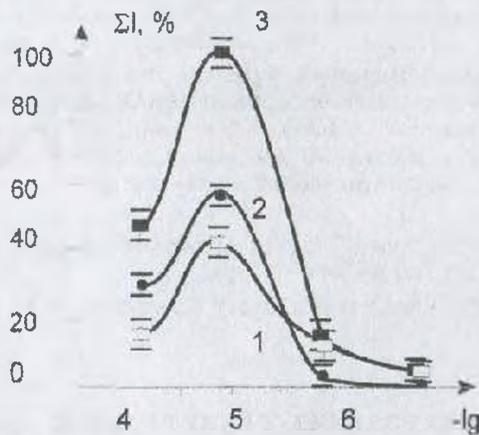


Рисунок 2 - Зависимость интегральной интенсивности люцигенин-опосредованной ХЛ (□) перевиваемых клеток глиомы крысы (С-6) от концентрации менадиона. 1 - на первой стадии ХЛ (0-8 мин), 2 - на второй стадии ХЛ (8-16 мин), 3- суммарная интенсивность ХЛ за 16 мин. Концентрация люцигенина $1,25 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Результаты и обсуждение. На рис.1 показаны кинетические зависимости люминол- и люцигенин-опосредованной ХЛ суспензии перевиваемых клеток глиомы крысы (С-6) при действии менадиона. Видно, что суммарный выход ХЛ, регистрируемой с помощью люцигенина значительно выше, чем в случае применения люминола. Поскольку люминол является хемилюминесцентным индикатором всех АФК, NO и пероксинитрита, а люцигенин наиболее специфично реагирует с $O_2^{\cdot -}$, можно заключить, что менадион индуцирует в астроцитах образование $O_2^{\cdot -}$. Форма кинетических кривых люцигенин-опосредованной хемилюминесценции клеток С-6 зависит от концентрации менадиона. Добавление менадиона в диапазоне концентраций от $8 \cdot 10^{-5}$ моль/л до $1,62 \cdot 10^{-4}$ моль/л к монослойной культуре клеток С-6 в поддерживающей среде МЭМ приводит к двухстадийному индуцированию ХЛ. Первая стадия ХЛ имеет максимум спустя несколько секунд после добавления менадиона, а вторая – медленная стадия – начинает развиваться через 5-10 минут после внесения препарата. Параметры ХЛ на первой и второй стадиях кинетических кривых значительно различаются. На рис.2 показаны зависимости интегральной интенсивности ХЛ клеток С-6 от концентрации менадиона на первой (за 8 мин после внесения менадиона), на второй (за 8 последующих мин) и за 16 мин с момента начала развития процесса. Для трех анализируемых случаев максимальные значения выбранных нами параметров ХЛ наблюдались при концентрации менадиона $1,62 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Полученные данные свидетельствуют, что менадион индуцирует в клетках С-6 образование $O_2^{\cdot -}$ в первые секунды взаимодействия с плазматической мембраной и после проникновения в клетку. Из рис.1 видно, что значение интенсивности индуцированной менадином ХЛ астроцитов значительно ниже в присутствии СОД – высокоэффективного перехватчика супероксидных анион-радикалов. Это подтверждает основной вклад $O_2^{\cdot -}$ в исследуемый процесс. На кинетическую зависимость ХЛ клеток в присутствии менадиона никакого влияния не оказывает РТЮ – специфический перехватчик NO, а добавление N-ацетилцистеина к С-6 приводит к существенному подавлению выхода ХЛ на второй стадии изучаемой реакции. N-ацетилцистеин, благодаря наличию свободных SH-групп, может эффективно реагировать с пероксидом водорода, NO и пероксинитритом. Результаты, полученные в присутствии РТЮ, показывают, что NO, а, следовательно, и пероксинитрит, не вносят вклад в формирование ХЛ отклика клеток. Возможно, в люцигенинзависимую ХЛ С-6 при действии менадиона наряду с $O_2^{\cdot -}$ вносят вклад радикальные продукты, природа которых требует дополнительного

исследования. С другой стороны, следует учитывать и тот факт, что N-ацетилцистеин служит донором внутриклеточного цистеина, который необходим для синтеза глутатиона и, тем самым, может оказывать модифицирующее влияние на супероксид-генерирующие системы клеток, поскольку глутатион вступает в неферментативные реакции с $O_2^{\cdot -}$ и нейтрализует его [2].

Таким образом менадион индуцирует в клетках глиомы крысы люцигенин-опосредованную ХЛ, обусловленную преимущественным образованием $O_2^{\cdot -}$. Выход $O_2^{\cdot -}$ зависит от концентрации менадиона и имеет максимальное значение при концентрации этого препарата, равной $1,62 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Образование $O_2^{\cdot -}$ в клетках С-6, вероятно, происходит с участием нескольких редокс-систем, локализованных в различных компартментах клетки.

Литература

1. G.M.Cohen, M'd'Ar.Doherty Free radical mediated cell toxicity by redox cycling chemicals // Br.J.Cancer. 1987. Vol. 55. № 8 . P. 46-52 .
2. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain // Progr. In Neurobiol. 2000. №62. P. 649-671.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СИНАНТРОПНЫХ КЛЕЩЕЙ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

А.Н. Дударев

Научный руководитель – И.М. Прищепа
витебский государственный университет

Необходимость массового разведения аллергенных клещей диктуется рядом научно-прикладных задач, одной из которых является получение стандартных биопрепаратов для диагностики и лечения аллергии к клещам домашней пыли. Стандартизация аллергенных препаратов из клещей начинается со стандартизации сырья, что непосредственно связано с оптимизацией процесса культивирования клещей. Однако нехватка критериев качества культур клещей делало эту задачу незавершенной. С этой целью нами были изучены некоторые параметры культивирования клещей *D. pteronyssinus*, *D. farinae*

Клещи культивируются в термостатах при постоянной влажности и температуре воздуха. Оптимизированы начальные условия создания лабораторных культур *D. pteronyssinus* и *D. farinae*: температура воздуха - 25° С, относительная влажность воздуха 75% (создавали при помощи насыщенного раствора поваренной соли), изначальная влажность субстрата 14% и плотность заселения субстрата - 100 экз./г пыли. Основной единицей культивирования пароглифидных клещей является простая периодическая культура, в которой графическим методом определены границы лаг-фазы, экспоненциального и замедленного роста, плато и снижения численности [2].

Среды для клещей следует составлять из двух компонентов: питательного и субстрата, создающего для клещей жизненное пространство. Например, для клеща *D. pteronyssinus* субстратом являются утильные волосы, а пищей — смесь чешуек с дрожжами, а для *D. farinae* - субстратом может служить измельченная кутикула насекомых, а пищей — высушенные дафнии [3]. Однако питательные среды сами по себе обладают аллергенными свойствами. Поэтому необходимо достичь не только максимальной продуктивности роста клещей, но и минимальной аллергенности питательной среды. Для этого большинство авторов [4] предлагают использовать искусственные среды состоящие из витаминов, аминокислот, сахаров и др.

Нами использовались для культивирования клещей *D. pteronyssinus* различные питательные среды: щетина человека (волосы из электробрита), домашняя пыль с 35% щетины человека, волосы человека, сухой человеческий альбумин, равные количества порошка желатина и порошка пивных дрожжей. Важным показателем адекватности питательной среды являлась динамика роста количества клещей в среде в течение всего срока наблюдения. Волосы человека из электробрита (щетина), учитывая естественные условия обитания клещей, а также данные других авторов [1,5] рассматривали как полноценную питательную среду.

Жизнедеятельность и динамику изменения количества клещей в питательных средах оценивали регулярно - через 7-10 дней в течение 17 недель. Установлено, что среды, состоящие из сухого человеческого альбумина, были абсолютно неблагоприятными для роста клещей *D. pteronyssinus*. В питательных средах, содержащих желатин с дрожжевым порошком, клещи сохранились, но их количество существенно не увеличивалось. В среде, включавшей мелко нарезанные волосы человека, клещи сохраняли жизнедеятельность, и их