

Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. - 2009. - Vol. 6. - P.402-405.

6. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. N.Y. Academic Press. - 1982.

7. Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function // J. Neurochem. - 2005. - Vol. 94. - P. 1-14.

8. Thaler S., Choragiewicz T.J., Rejdaket R. et al. Neuroprotection by acetoacetate and β -hydroxybutyrate against NMDA-induced RGC damage in rat-possible involvement of kynurenic acid // Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. - 2010. - Vol. 248. - P. 1729–1735.

9. White H.S., Wolf H.H., Swinyard E.A. et al. A neuropharmacological evaluation of felbamate as a novel anticonvulsant // Epilepsia. - 1992. - Vol. 33, № 3. - P. 564-572.

Координаты для связи с автором: Полянский Вячеслав Алексеевич – канд. мед. наук, доцент кафедры биофизики, информатики и мед. аппаратуры ОНМУ, тел.: +380-48-717-89-16, e-mail: godlevsky@odmu.edu.ua.



УДК 616.011.2-001.8-018:612.015.8]:599.323.4-053.3-092.9

Е.Н. Сазонова¹, О.А. Лебедево^{1,2}, Ю.Б. Малофей¹, И.М. Мальцева³, С.С. Тимошин¹

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ И ГЕНЕРАЦИЯ СУПЕРОКСИД-АНИОН-РАДИКАЛА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ПУЛЬМОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ БЕЛЫХ КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ АНТЕНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ

¹Дальневосточный государственный медицинский университет,

680000, ул. Муравьева-Амурского, д. 35, тел.: 8(4212) 32-63-93, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;

²Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ охраны материнства и детства, 680022, ул. Воронежская, д. 49, кор.1, e-mail: iomid@yandex.ru;

³Медико-эстетический центр «Биарриц», 680000, ул. Дзержинского, д. 71, г. Хабаровск

Резюме

Исследовали первичную культуру пульмональных фибробластов новорожденных белых крыс, подвергнутых тяжелой антенатальной гипоксии. Оценивали пролиферативную активность клеточной культуры с помощью автордиографии с меченым тритием тимидином; количество ядрышек в ядрах фибробластов; с помощью хемилюминесцентного метода измеряли интенсивность генерации супероксид-анион-радикала. Выявлено, что в культуре пульмональных фибробластов новорожденных крыс, перенесших антенатальную гипоксию, генерация супероксид-аниона на 80 % превышала аналогичный показатель в контроле; имело место достоверное уменьшение количества ядрышек; отсутствовала характерная для контактного торможения отрицательная корреляция между плотностью культуры и ее пролиферативной активностью. Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что первичная культура фибробластов, выделенная из легких новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии, имеет существенные отличия от контроля.

Ключевые слова: антенатальная гипоксия, культура фибробластов, пролиферативная активность, супероксид-анион-радикал.

E.N. Sazonova¹, O.A. Lebedko^{1,2}, Y.B. Malofei¹, I.M. Maltzeva³, S.S. Timoshin¹

PROLIFERATIVE ACTIVITY AND SUPEROXIDE ANION GENERATION IN PULMONARY FIBROBLASTS PRIMARY CULTURE FROM NEONATAL RATS AFTER ANTENATAL HYPOXIA

¹The Far Eastern state medical university;

²Mother and Child Institute of Siberian Branch of Russian Academy for Medical sciences;

³Medical esthetic center «Biarritz», Khabarovsk

Summary

Antenatal hypoxia is a universal damaging factor in “mother-fetus” system and one of the leading pathogenetic elements of respiratory organs pathology formation. The primary culture of pulmonary fibroblasts of newborn albino rats subjected to a severe antenatal hypoxia was investigated. The proliferative activity of fibroblasts was estimated by autoradiography with ³H-thymidine; quantity of nucleolar in fibroblasts nucleus was analyzed; superoxide-anion generation

was measured by chemiluminescence's method. It was revealed that in pulmonary fibroblasts culture from the newborn rats, subjected to a severe antenatal hypoxia, superoxide-anion generation was increased by 80 %; reduction of nucleoli quantity took place; there was not negative correlation between culture density and its proliferative activity. The results showed that primary culture of pulmonary fibroblasts of newborn albino rats subjected to a severe antenatal hypoxia, had essential difference from the control.

Key words: antenatal hypoxia, fibroblast culture, proliferative activity, superoxide anion.

Аntenатальная гипоксия является одним из ведущих факторов риска формирования патологии органов дыхания. Проведенные нами ранее экспериментальные исследования свидетельствуют, что антенатальное гипоксическое воздействие индуцирует ряд постнатальных морфогенетических изменений в респираторной системе. При этом, формирование постгипоксического структурного следа в легких сопровождается развитием оксидативного стресса на органном и организменном уровнях, в том числе декомпенсированной гиперпродукцией супероксид-анион-радикала [2-4]. Данные литературы свидетельствуют о ведущей роли этого радикала в межклеточной и внутриклеточной редокс-сигнализации, а также в развитии патологических состояний [9]. Именно супероксид-анион-радикал является пусковым фактором каскада реакций свободнорадикального окисления, образования наиболее агрессивных метаболитов кислорода – гидроксил-радикалов, токсичных дериватов мембранных фосфолипидов и т.п. Вместе с тем, известна существенная роль активных кислородных метаболитов в регуляции процессов клеточного деления [1]. Поскольку в процессах патологического ремоделирования легких в ответ на гипоксическое воздействие значимую роль играют пульмональные фибробласты, представляет интерес выяснение вопроса о соотношении в данной клеточной популяции интенсивности генерации супероксид-аниона с морфогенетическими процессами.

Цель исследования заключалась в оценке процессов генерации супероксид-анион-радикала и пролиферативной активности первичной культуры пульмональных фибробластов новорожденных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию.

Материалы и методы

В работе использовали потомство рандомбредных 3-месячных белых крыс-самок, подвергнутых гипоксическому воздействию с 14 по 19 сут гестации. Беременных крыс-самок помещали в барокамеру СБК-48 натошак и «поднимали» на высоту 9000 м над уровнем моря, что соответствовало давлению 224 мм рт. ст. и парциальному давлению кислорода 42 мм. рт. ст. Ежесуточную четырехчасовую экспозицию проводили с 9 до 13 ч в течение 6 дн. По данным литературы, такая гипоксия может быть расценена как тяжелая [9].

Первичную культуру пульмональных фибробластов получали от 2-суточного потомства интактных и подвергнутых гипоксическому воздействию крыс-самок. Фрагмент правого легкого помещали в питательную среду DMEM с антибиотиками (пенициллин 100 ед/мл; гентамицин 10 мг/мл) и выдерживали при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем производили механическую дезагрегацию биоптата с последующей обработкой коллагеназой панкреаса краба (500 ед/мл при 37°C в течение 15 мин). После двукратной

отмывки раствором Хенкса, полученный материал высеивали в культуральные флаконы. Культивирование проводили в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки в газовой среде с 5% содержанием CO₂. Для исследования использовали клетки 4 пассажа.

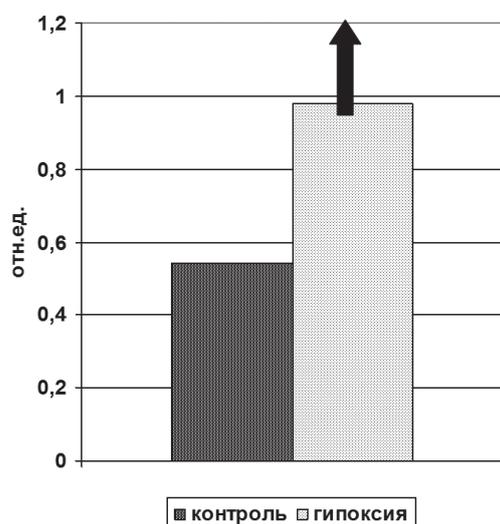
Для проведения хемилюминесцентного (ХМЛ) исследования фибробласты снимали с подложки с помощью раствора трипсина-Версена и трехкратно отмывали раствором Хенкса. Для оценки интенсивности генерации супероксид-анион-радикала в культуре фибробластов применяли метод люцигенин-зависимой ХМЛ [10]. Регистрацию ХМЛ осуществляли на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER».

О пролиферативной активности судили по анализу процессов синтеза ДНК с помощью автордиографии с меченым тритием тимидином. Для приготовления радиоавтографов клеточные монослои помещали в раствор ³H-тимидина (1 мкКи/мл) на 1 ч. После отмывки монослоев в растворе Хенкса и фиксации в 96% этаноле производили приготовление радиоавтографов по принятой в лаборатории методике. В радиоавтографах монослоев клеточных культур, окрашенных гематоксилином Лилли-Майера, оценивали индекс меченых ядер (ИМЯ) и интенсивность метки (ИМ), косвенно характеризующую скорость ДНК-синтетических процессов. Для анализа ИМ в клеточной популяции подсчитывали долю (%) фибробластов с высокой интенсивностью метки (сливная метка) и долю (%) фибробластов с низкой интенсивностью метки (единичные треки). Кроме того, подсчитывали количество ядрышек в ядрах фибробластов при просмотре 200 ядер фибробластов. Плотность культуры оценивали по среднему количеству фибробластов в стандартизованном поле зрения микроскопа «Jenalumar» (окуляр х 6,3; объектив х 100) при просмотре всего клеточного монослоя.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли по критерию Стьюдента при помощи пакета прикладных программ Statistica 5.0.

Результаты и обсуждение

Анализ ХМЛ-показателей продемонстрировал, что в культуре пульмональных фибробластов новорожденных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию, генерация супероксид-аниона на 80 % превышала аналогичный показатель в контроле (рисунк). Известно, что основным генератором супероксид-анион-радикала является НАДФН-оксидаза [6]. Показано увеличение экспрессии НАДФН-оксидазы в пульмональных фибробластах пациентов с патологией легких [8]. Таким образом, антенатальная гипоксия провоцирует оксидативный стресс в ткани легкого на постнатальном этапе онтогенеза на тканевом и клеточном уровне.



Интенсивность люцигенин-зависимой ХМЛ в культуре пульмональных фибробластов новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии

Примечание. ↑ - $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль».

В ядрах фибробластов первичной культуры из легких новорожденных животных, перенесших антенатальную гипоксию, было зарегистрировано достоверное уменьшение количества ядрышек, что косвенно отражает снижение анаболической активности клеток (табл. 1).

Таблица 1

Показатели ДНК-синтетической активности и количества ядрышек в первичной культуре пульмональных фибробластов новорожденных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию

Показатель	Контроль	Гипоксия
Количество ядрышек	3,02±0,09	2,77±0,06*
ИМЯ, %	11,30±1,45	10,53±1,26
Доля ядер с низкой интенсивностью метки, %	28,05±3,47	24,10±2,77
Доля ядер с высокой интенсивностью метки, %	71,95±3,47	76,03±2,78

Примечание. * - отличие от контроля достоверно; $p < 0,05$.

При анализе показателей процессов пролиферации не было выявлено достоверного отличия количества ДНК-синтезирующих клеток (ИМЯ,%) в контрольных и «постгипоксических» клеточных монослоях. Также не было отличий контрольных и экспериментальных монослоев по соотношению ядер фибробластов с высокой и низкой ИМ (табл. 1). Вместе с тем, удалось зарегистрировать интересную закономерность: контрольная культура фибробластов характеризовалась достоверной сильной отрицательной корреляционной связью (коэффициент корреляции = -0,79) между показателями ИМЯ и плотностью культуры. Аналогичная зависимость имела место между показателями ИМ и плотностью культуры (коэффициент корреляции = -0,70). Выявленная отрицательная корреляционная связь, по-видимому, отражает хорошо известный феномен «контактного торможения», который заключается в том, что при увеличении плотности культуры ее пролиферативная активность снижается, вплоть до полного прекращения клеточного деления. Однако в

монослоях культуры постгипоксических фибробластов подобную закономерность выявить не удалось: корреляционная зависимость между показателями пролиферативной активности и плотностью культуры была недостоверна; коэффициент корреляции между показателями ИМЯ и плотностью культуры составил всего -0,30; коэффициент корреляции между показателями ИМ и плотностью культуры был положительным и составил 0,25.

Выявленная закономерность нашла отражение при анализе показателей пролиферативной активности в стандартизированной по плотности монослоя выборке (плотность монослоя более 100 клеток в поле зрения) (табл. 2). В этой серии монослоев фибробласты, выделенные от новорожденных животных, перенесших антенатальную гипоксию, характеризовались достоверным повышением ДНК-синтетической активности, по сравнению с контрольными монослоями. Имело место достоверное возрастание доли фибробластов с высокой интенсивностью метки и отчетливая статистическая тенденция ($p=0,07$) к повышению индекса меченых ядер.

Таблица 2

Показатели ДНК-синтетической активности в «плотных» монослоях первичной культуры пульмональных фибробластов новорожденных белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию

Показатель	Контроль	Гипоксия
ИМЯ, %	7,71±0,48	9,73±1,10
Доля ядер с низкой интенсивностью метки, %	33,27±3,91	20,60±1,57*
Доля ядер с высокой интенсивностью метки, %	66,73±3,91	79,80±1,57*

Примечание. * - отличие от контроля достоверно; $p < 0,05$.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что первичная культура фибробластов, выделенная из легких новорожденных белых крыс, подвергнутых тяжелой антенатальной гипоксии, имеет существенное отличие от первичной культуры пульмональных фибробластов, выделенных из легких интактных животных. Можно предполагать, что в культуре «постгипоксических» фибробластов имеет место угнетение механизмов контактного торможения на фоне гиперпродукции супероксид-анион-радикала.

Контактное торможение, как частный случай межклеточного взаимодействия, – это фундаментальный биологический процесс, влияющий на многие, если не все клеточные функции. В литературе показано, что не повреждающий клетку (не цитотоксичный) оксидативный стресс нарушает межклеточное взаимодействие [11]. Возможно, данный механизм лежит в основе стимулирующего влияния активных форм кислорода на пролиферативную активность клеток [1, 4], канцерогенного влияния избытка активных форм кислорода [5], участия активных форм кислорода в развитии гиперпластических процессов. Полученные нами данные, в определенной степени, соответствуют результатам исследования [8] об увеличении экспрессии НАДФН-оксидазы, главного фермента образования супероксид-анион-радикала, в пульмональных фибробластах пациентов с идиопатическим легочным фиброзом.

Литература

1. Гамалей И.А., Полозов Ю.С., Кирпичникова К.М. и др. Распределение эмбриональных фибробластов крысы по фазам клеточного цикла в присутствии ингибиторов образования активных форм кислорода и N-ацетилцистеина // Цитология. – 2001. – № 7. – С. 633-637.
2. Гусева О.Е., Лебедько О.А., Тимошин С.С. Влияние синтетического аналога дерморфина на ДНК-синтетическую активность эпителиоцитов и гладких миоцитов трахеи новорожденных белых крыс, подвергнутых пренатальной гипоксии // Дальневост. мед. журнал. – 2009. – № 1. – С. 95-97.
3. Гусева О.Е., Лебедько О.А., Тимошин С.С. Олигопептид N-Arg-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-ОН корректирует постгипоксические нарушения синтеза ДНК в эпителиоцитах трахеи и биогенеза свободных радикалов в легких новорожденных белых крыс // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2009. – № 2, Т. 37. – С. 18 -20.
4. Лебедько О.А., Тимошин С.С., Беспалова Н.Н. Влияние ангиотензина II на пролиферативную активность эпителиоцитов и гладкомышечных клеток трахеобронхиальной системы новорожденных белых крыс // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2000. – Т. 130, № 7. – С. 28-30.
5. Лю М.Б., Подобед И.С., Едыгенова А.К. и др. Кислородно-перекисный механизм канцерогенеза и модификация ДНК // Успехи соврем. биологии. – 2005. – № 2. – С. 179-188.
6. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс: прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
7. Савченков Ю.И., Лобынцев К. С. Очерки физиологии и морфологии функциональной системы мать-плод. – М.: Медицина, 1980. – С. 72-105.
8. Amara N., Goven D., Prost F. et al. NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGF- β 1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts // Thorax. – 2010. – Vol. 65, № 8. – P. 733-738.
9. Montero A.J., Jassem J. Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer // Drugs. – 2011. – Vol. 71, № 11. – P. 1385-1396.
10. O'Donnell V.B., Azzi A. High rates of extracellular superoxide generation by cultured human fibroblasts: involvement of a lipid-metabolizing enzyme // Biochem J. – 1996. – Vol. 318 (Pt. 3). – P. 805- 812.
11. Parrish A.R., Catania J.M., Orozco J., Gandolfi A.J. Chemically induced oxidative stress disrupts the E-cadherin/catenin cell adhesion complex // Toxicological Sciences. – 1999. – Vol. 51. – P. 80-86.

Координаты для связи с авторами: Сазонова Елена Николаевна – доктор мед. наук, зав. кафедрой нормальной физиологии ДВГМУ, вед. науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ, тел.: +7-924-206-34-63, e-mail: sazen@mail.ru; Лебедько Ольга Антоновна – зав. КДЛ Хабаровского филиала ДНЦ ФПД СО РАМН-НИИ ОМИД, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ; Малофей Юлия Борисовна – канд. биол. наук, науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ, e-mail: malofey2009@mail.ru; Мальцева Ирина Михайловна – канд. мед. наук, гл. врач Медико-эстетического центра «Биарриц»; Тимошин Сергей Серафимович – зав. ЦНИЛ ДВГМУ, доктор мед. наук, профессор.

