НЕЙРОХИМИЯ

т. 6, № 4, 1987

УДК 577.154+577.150.5+578.085.23

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭСТРАДИОЛА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ

НАЗАРЯН К. Б., *ГЕВОРКЯН Э. С., КАГРАМАНЯН М. С., ЕРОЯН Л. Г., МАНУКЯН К. Л., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,
*Ереванский государственный университет

Изучено действие эстрадиола 17β на активность ряда гликолитических ферментов в культуре клеток мышиной нейробластомы С1300. Установлено активирующее влияние эстрадиола на гексокиназу, фосфофруктокиназу и пируваткиназу (при отсутствии влияния на активность енолазы и D-фосфоглицеромутазы). В клеточных культурах фибробластов мыши и лимфоцитов человека активация этих ферментов была выражена значительно слабее. Определенной корреляции между процентом делящихся клеток в указанных культурах и повышением активности выявлено не было. Активирующий эффект эстрадиола на ферменты в клетках нейробластомы, видимо, отражает особенности регуляции гликолиза в нейронах, так как сходную картину воздействия эстрадиола наблюдали в нервной ткани *in vivo*.

Изучение действия физиологически активных соединений на функции головного мозга затруднено ввиду его морфо-функциональной гетерогенности и разнонаправленности динамики ряда протекающих в нем процессов. В связи с этим становится актуальным использование для нейрохимических исследований клонированных культур различных опухолей мозга нейронального и глиального происхождения. Как объект исследования они обладают рядом преимуществ: гомогенность морфологического состава, стабильность, сохранение ряда свойств, присущих нормальной ткани [1]. Поэтому для изучения воздействия стероидных гормонов, в частности эстрадиола, на нейроны в качестве модели избрали культуру клеток мышиной нейробластомы перевиваемой линии С1300, которая сохраняет целый ряд специфических свойств нейронов: типичная морфология клеток (аксоны, содержащие нейрофиламенты), генерация потенциалов действия, синтез ферментов метаболизма медиаторов, наличие нейроспецифической енолазы и др. [2]. С другой стороны, необходимо учитывать определенную специфику поведения клеток в условиях культивирования *in vitro*. В связи с этим в качестве

7—698

контроля нами были использованы две другие клеточные культуры: мышиных фибробластов (L-929) и суспензионная, в норме неделящаяся, культура лимфоцитов периферической крови человека. При культивировании указанных клеток была изучена активность ряда гликолитических ферментов: гексокиназы (КФ 2.7.1.2), фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11), пируваткиназы (КФ 2.7.1.40), енолазы (КФ 4.2.1.11), D-дифосфоглицератзависимой D-фосфоглицеромутазы (КФ 5. 4. 2. 1.).

Целью настоящей работы было выявление особенностей регуляторного влияния эстрадиола на гликолиз в клетках нейробластомы по сравнению с культурами других клеток, что может способствовать пониманию специфики энергетического метаболизма в нейронах, поскольку гексокиназа, енолаза и пируваткиназа в головном мозгу представлены, в основном, органоспецифическими формами, целесообразность экспрессии которых остается невыясненной [3].

Материалы и методы

Условия культивирования клеток. В экспериментах были использованы следующие клеточные линии: клетки мышиной нейробластомы С1300, клон N2a, клетки фибробластов мыши линии L-929, клетки культуры лимфоцитов периферической крови человека. Клетки нейробластомы и фибробластов мыши культивировали в модифицированной среде Игла с добавлением 10%-ной сыворотки крови крупного рогатого скота. До эксперимента клетки поддерживались в логарифмической фазе роста несколько генераций, а затем высевались в количестве 3×10^5 клеток на флакон. Выращивали клетки во флаконах Карреля при 37°. Длительность культивирования для клеток нейробластомы составляла 40, а для фибробластов—24 ч. Клетки дезагрегировали 0.25%-ным раствором трипсина. Культуру лимфоцитов получали из цельной периферической крови человека, которую гепаринизировали из расчета 25 МЕ гепарина на 1 мл крови. Выделение из крови очищенной популяции лимфоцитов проводили в асептических условиях в градиенте плотности (1,077) фиколл-верографина. Кровь, смешанную с равным объемом раствора Хенкса наслаивали на градиент в соотношении 3:1. Центрифугировали в течение 35 мин при 400 *g* при комнатной температуре. Выделенную и отмытую фракцию лимфоцитов переводили в культуру, содержавшую сыворотку крови крупного рогатого скота и модифицированную среду Игла в соотношении 1:3:12. Для стимуляции лимфоцитов к делению в культуру добавляли фитогемагглютинин (ФГА) (IBF, Франция) из расчета 0.2 мл ФГА на 10 мл культуральной смеси. Культивирование проводили в течение 70 ч при 37°.

Обработка эстрадиолом. Эстрадиол 17β («Sigma», США) растворяли в 95%-ном этаноле и добавляли в культуру *ex tempore* за 3,5 ч до конца культивирования в конечной концентрации 25, 50, 100 мкг/мл. Контролем служила необработанная, а также обработанная этанолом культура. Дезагрегированные клетки собирали и дважды отмывали холодным раствором ЭДТА. Суспензию клеток обрабатывали в ультра-

звуковом дезинтеграторе в трис-HCl буфере (pH 7,5) при 0° в течение 30 с.

Митотическая активность. Для определения уровня митотической активности используемых культур, а также выяснения возможного ее изменения под действием эстрадиола были получены препараты метафазных хромосом. После инкубации с эстрадиолом во флаконы с клетками нейробластомы добавляли свежую среду с добавлением колхицина (0,25 мкг/мл) за 2 ч до фиксации. Гипотоническую обработку проводили 0,55%-ным раствором KCl при 37° в течение 7 мин. Клетки фиксировали свежеприготовленной охлажденной смесью метанол-ледяная уксусная кислота (3:1). Суспензию клеток наносили на охлажденные предметы стекла и окрашивали азур-эозином в течение 5 мин. Подсчитывали количество митозов на 1000 клеток.

Определение белка и ферментативной активности. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [4]. Активность гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы определяли спектрофотометрически, при длине волны 340 нм на спектрофотометре «Specord M-40» (Carl Zeiss, ГДР) в непрерывном режиме регистрации. Гексокиназная реакция сопряжена с глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной и за ее активностью следили по приросту NADPH. Инкубационная смесь для определения активности гексокиназы содержала: 50 мМ трис-HCl (pH 7.5), 45 мМ HEPES, 3,7 мМ D-глюкозы, 7,5 мМ $MgCl_2$ 220 мМ АТР, 25 мг/мл NADP, 1 ед. глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Активность фосфофруктокиназы определяли по убыли NADP в сопряженной системе, содержавшей 50 мМ Na^+-фосфатного буфера (pH 8.0), 1 мМ ЭДТА, 0,02 мМ дитиотрейтола, 5 мМ $MgCl_2$, 25 мМ KCl, 0,5 мМ NH_4Cl, 0,2 мМ NADH, 0,1 мМ фруктозо-6-фосфата, 0,5 мМ АТР, 2 мМ фосфоенолпирувата, 30 мкг/мл лактатдегидрогеназы и 60 мкг/мл пируваткиназы. Пируваткиназную активность определяли по убыли NADH в сопряженной системе, содержавшей 50 мМ трис-HCl буфера (pH 7,5): 0,8 мМ фосфоенолпирувата, 6 мМ $MgCl_2$, 3 мМ АДР, 100 мМ KCl, 0.13 мМ NADH, 1 ед. лактатдегидрогеназы. Активность енолазы определяли по Baranowski [5], а D-фосфоглицерамутазы — по Grisolia [6]. Общий объем смеси составлял 0,5 мл. Ферментативные реакции запускали добавлением 100—300 мкг белка в пробе и проводили при температуре 30° в течение 5—15 мин. Активность ферментов выражали в процентах по отношению к контролю. Результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента [7].

Результаты и обсуждение

Результаты измерения активности фосфофруктокиназы, гексокиназы, пируваткиназы, енолазы и фосфоглицеромутазы показывают (рис. 1), что при инкубации культуры клеток нейробластомы с эстрадиолом имело место статистически достоверное повышение активности для первых трех ферментов. Ключевые гликолитические ферменты, гексокиназа и фосфофруктокиназа, наряду с пируваткиназой, относятся к числу

регуляторных, функционирующих по неравновесному типу [8]. Повышение активности этих ферментов по сравнению с контролем под влиянием эстрадиола имеет важное функциональное значение, так как приводит к активации гликолиза в целом. При 3,5-часовой экспозиции это наиболее отчетливо выражается при воздействии 25 и 50 мкг/мл эстрадиола 17β. Активность же функционирующих по «равновесному» типу двух других ферментов—енолазы и фосфоглицеромутазы оставалась на уровне контрольной. Поскольку енолаза и фосфоглицеромутаза не выявили какой-либо тенденции к изменению активности при воздействии эстрадиола, а в литературе нет указаний на их индуцибельность, дальнейшие исследования проводили только на регуляторных ферментах гликолиза.

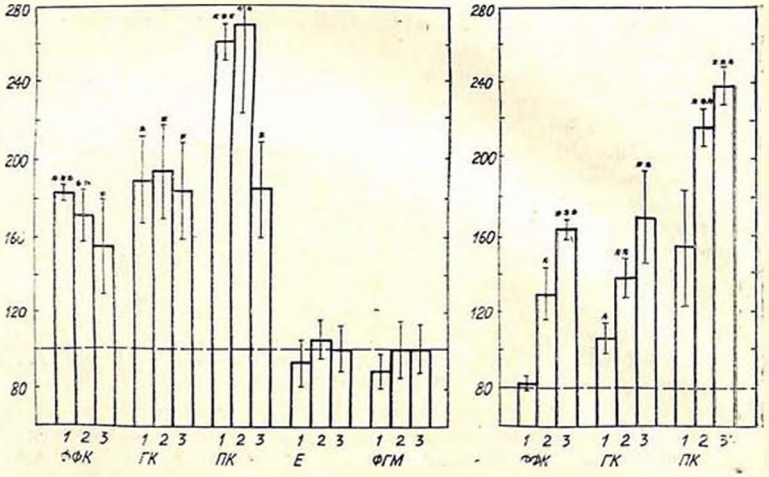

Рис. 1. Действие эстрадиола 17 β в различных дозах на активность фосфофруктокиназы (ФФК), гексокиназы (ГК), пируваткиназы (ПК), енолазы (Е) и фосфоглицеромутазы (ФГМ) культуры клеток нейробластомы при 3,5-часовой инкубации. По оси ординат—процент ферментативной активности по сравнению с контролем (100%). Концентрации эстрадиола: *1*—25 мкг/мл, *2*—50 мкг/мл и *3*—100 мкг/мл. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, $n=5$

Рис. 2. Действие эстрадиола (50 мкг/мл) на активность ФФК, ГК и ПК при различных сроках экспозиции гормона. *1*—1 ч, *2*—2 ч, *3*—3,5 ч. Остальные обозначения, как на рис. 1

Повышение активности этих ферментов при воздействии эстрадиола обнаружено нами в мозгу крысы в условиях *in vivo* [9]. При этом было показано, что ингибирование биосинтеза белка на стадии транскрипции снимало эффект активации; таким образом, можно допустить, что последняя имела место в результате синтеза исследуемых ферментов *de novo*. В условиях культуры ткани временная зависимость между

добавлением гормона в среду и ферментативной индукцией может быть иной, чем в опытах *in vivo*, поэтому было изучено действие эстрадиола при различных сроках после его добавления (рис. 2). Оказалось, что повышение активности фосфофруктокиназы, гексокиназы и пируваткиназы зависело от продолжительности инкубации культуры клеток с гормоном и достигало максимума при 3—3,5-часовой экспозиции. Такой результат совпадает с литературными данными, полученными при изучении гормональной индукции ряда ферментов *in vitro* [10]. Следовательно, и по этому параметру культура клеток нейробластомы может служить адекватной моделью нервной ткани.

Другая, интенсивно делящаяся в норме клеточная линия фибробластов китайского хомячка также обнаруживала тенденцию к повышению ферментативной активности фосфофруктокиназы и гексокиназы при воздействии эстрадиола, однако оно оказалось статистически достоверным только в случае гексокиназы при двух концентрациях эстрадиола, но и при этом процент прироста активности был значительно ниже, чем в опытах с нейробластомой (рис. 3, *а*).

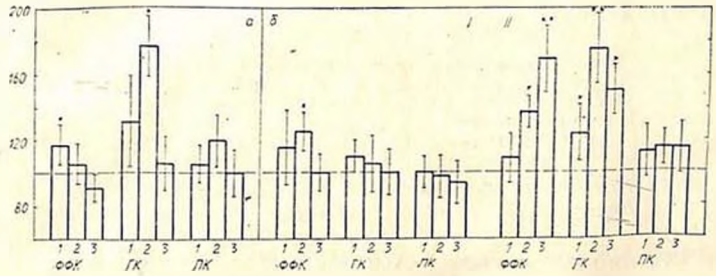

Рис. 3. Действие эстрадиола в различных дозах на активность ФФК, ГК, ПК культуры клеток фибробластов (*а*) и лимфоцитов (*б*). I—без стимуляции, II—стимулированные; остальные обозначения, как на рис. 1

Чтобы выявить возможность существования взаимосвязи между способностью клеток к делению и степенью чувствительности регуляторных ферментов гликолиза к эстрадиолу для дальнейшей работы была использована неделящаяся культура клеток лимфоцитов периферической крови человека. Как видно из рис. 3, *б*, при тех же воздействиях эстрадиолом активность указанных ферментов статистически достоверно не менялась. Однако, если лимфоциты стимулировать к делению митогеном—ФГА, картина изменялась. Эстрадиол достоверно активировал гексокиназу и фосфофруктокиназу, повышая таким образом активность гликолиза в целом. Это наблюдение хорошо согласуется с литературными данными об активации гликолиза и окислительного фосфорилирования в стимулированных лимфоцитах [11]. Тем не менее, надо подчеркнуть, что несмотря на достоверную активацию фосфофруктокиназы и пируваткиназы в стимулированных лимфоцитах и некоторое по-

вышение активности в фибробластах, ни в одном из этих случаев степень повышения активности не доходила до уровня, наблюдаемого в клетках нейробластомы. Интенсивность клеточного деления при этом не играет существенной роли, о чем свидетельствуют результаты определения митотического индекса для этих клеточных культур (табл.). Установлено, что воздействие эстрадиола в дозе 25 и 50 мкг/мл несколько снижало темп деления в культуре нейробластомы и довольно значительно—в культуре фибробластов, а доза 100 мкг/мл оказалась явно токсичной для них. Таким образом, поскольку эстрадиол в концентрации 25 и 50 мкг/мл при 3-часовой инкубации не оказывал заметного влияния на митотический индекс культуры нейробластомы, вероятно, эти дозы не оказывали выраженного токсического эффекта. Однако при хроническом 4-дневном введении эстрадиол, как и дексаметазон, вызывал весьма сильное токсическое действие уже в дозе 10 мкг/мл [12], что необходимо учитывать при хронических экспериментах. Иначе обстоит ситуация в стимулированных лимфоцитах. Имея значительно меньший митотический индекс, их деление активировалось при дозах эстрадиола 25 и 50 мкг/мл и возвращалось к контрольному уровню при дозе 1000 мкг/мл.

Таблица

Зависимость величины митотического индекса от различных доз эстрадиола при 3,5 ч инкубации

Концентрация эстрадиола, мкг/мл	Контроль	25	50	100
Митотический индекс	16	20	33	16

Все это свидетельствует о том, что степень активации эстрадиолом регуляторных ферментов гликолиза непосредственно не связана со скоростью деления клеточной популяции. Вероятно, индуцибельность изученных ферментов в клетках нейробластомы—свойство, присущее и нейронам *in vivo*, которые в норме не делятся. Таким образом, можно с определенной долей вероятности утверждать, что культура клеток нейробластомы по механизму регуляции гликолиза при воздействии стероидных гормонов находится ближе к нейронам *in vivo*, чем к клеточным культурам фибробластов и делящихся и неделящихся лимфоцитов. Дополнительным свидетельством этого является факт значительной активации пируваткиназы, наблюдавшийся только в культуре нейробластомы, так как из литературных данных [13] следует, что только в нервной ткани пируваткиназа обнаруживает некоторые регуляторные свойства.

PECULIARIETIES OF ESTRADIOL EFFECT ON THE ACTIVITY OF SOME GLYCOLYTIC ENZYMES IN NEUROBLASTOMA CELL CULTURE

NAZARYAN K. B., *GEVORKIAN E. S., KAGRAMANYAN M. S., EROYAN L. G., MANUKYAN K. L., KAZARYAN B. A.

Institute of Experimental Biology, Arm. SSR Acad. Sci., Yerevan
*Yerevan State University

Estradiol 17β induces activity of hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase in the cell culture of mouse neuroblastoma C 1300 much more pronouncedly than in the culture of mouse fibroblasts and human lymphocytes. No definite correlation between the percent of dividing cells and increase in the enzyme activity has been established in these cell cultures. It is supposed that the drastic activating effect of estradiol 17β on the neuroblastoma enzymes is due to the peculiarities of glycolysis regulation in neurons because a similar pattern of estradiol 17β action is described for nervous tissue in vivo conditions.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Haffke S. G., Seeds N. W.* Life Sci., v. 16, № 11, p. 1649—1658, 1975.
2. *Amano T., Richelson E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 69, № 1, p. 258—263, 1972.
3. *Keller A., Scarns H., Nermet A., Pujol I.—F.* J. Neurochem., v. 36, № 4, p. 1389—1397, 1981.
4. *Lowry O. H., Rosenbrough N. I.* J. Biol. Chem., v. 193, № 2, p. 265—275, 1951.
5. *Baranowski T., Wolna E.*—In: Methods in Enzymology., v. 42, p. 335—338, N.—Y. Acad. Press., 1975.
6. *Grisolia S., Carrerac I.*—In: Methods in Enthymology, v. 90, p. 435—450, N.—Y Acad. Press, 1982.
7. *Лакин Г. Ф.* Биометрия, М., Высшая школа, 1973.
8. *Ньюсхолм Э., Старт К.* Регуляция метаболизма, М., Мир, 1977.
9. *Назарян К. Б., Геворкян Э. С., Костанян А. А., Акопян Н. С., Паносян Г. А.* Журн. невропатол. и психиатрии, т. LXXXVII, вып. 6, с. 870—873, 1987.
10. *Протасова Т. Н.* Гормональная регуляция активности ферментов, М., Медицина, 1975.
11. *Лима Н. Р.* Стимуляция лимфоцитов, М., Медицина, 1971.
12. *Sandquist D., Williams T. H., Sahu S. K.* Exper. Cell Res., v. 113, № 2, p. 375—381, 1978.
13. *Rolleston F. S., Newsholme E. A.* Biochem. J., v. 104, № 3, p. 524—533, 1967.

Поступила 17. II 1987