

УДК 577. 175. 859 : 577. 157. 042

## ВЛИЯНИЕ ГЛИЦИНА НА УРОВЕНЬ АТФ- И $Ca^{2+}$ -АКТИВИРУЕМОГО ПРОТЕОЛИЗА КЛЕТОК ГЛИОМЫ С<sub>6</sub>

Т.В. Балашевич, аспирант; В.Н. Никандров, д.б.н., профессор;  
Р.И. Гронская, м.н.с.; М.К. Тумлович, м.н.с.

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

*Анализ изменения активности АТФ- и  $Ca^{2+}$ -зависимых протеиназ культуры С6 под влиянием глицина показал, что добавление глицина в питательную среду оказывает разноплановое действие на уровень АТФ- и  $Ca^{2+}$ -активированного протеолиза в зависимости от периода экспозиции культуры. Активность кальпаина-2 снижается при 20-минутном, 1- и 3-суточном влиянии глицина на культуру С6, активность АТФ-зависимой протеиназы – при 1-суточном. Результаты исследования могут быть использованы в современной нейроонкологии, нейрофармакологии и биологии клетки.*

**Ключевые слова:** кальпаин, протеолитическая активность,  $Ca^{2+}$ -зависимая протеиназа, глиома, глицин.

*The analysis of C6 culture ATP- and  $Ca^{2+}$ -dependent proteinases alteration showed that depending on the culture exposure period glycine addition to the nutrient medium had a various affect on ATP- and  $Ca^{2+}$ -activated proteolysis level. The calpain-2 activity of C6 culture is reduced under the 20 min, 1 and 3 days glycine affect, the ATP-dependent proteinase activity – 1 day. The results of current research can be used in modern neurooncology, neuropharmacology and cell biology.*

**Key words:** calpain, proteolytic activity,  $Ca^{2+}$ -dependent proteinase, glioma, glycine.

### Введение

В настоящее время характер перестроек звеньев протеолиза в клетках нервной ткани в зависимости от их функционального и метаболического состояния остаётся недостаточно изученным. Среди метаболитов нервной ткани важную роль играет глицин, являющийся не только интермедиатом азотистого и энергетического обмена, но и тормозным медиатором спинного и нижних отделов головного мозга. Между тем, данные литературы о влиянии глицина на состояние клеток глиии мало численны и фрагментарны.

Уровень протеолитических реакций в клетках нейроглии при её различных метаболических состояниях играет важную роль в регуляции нейрофизиологических процессов. Без участия протеолитических реакций невозможна реализация большинства процессов жизнедеятельности нервной ткани, а также инициация и генезис основных нейроратологических процессов [4, 5]. Важными звеньями протеолиза являются  $Ca^{2+}$ -зависимые протеиназы I и II (или кальпаин-1 и -2, соответственно), которые обнаружены практически во всех изученных тканях позвоночных [1], в том числе нервной [10, 15, 26]. Ряд многочисленных исследований показал, что  $Ca^{2+}$ -зависимые протеиназы участвуют в процессах пролиферации [16, 30], дифференцировки клеток [19], передачи импульсов [17], перестройки цитоскелет-мембранных комплексов [9], а также в апоптозе и генезисе нейропатологических состояний [1]. Так, при Болезни Альцгеймера, инсульте, болезни Паркинсона, множественном склерозе, травматическом повреждении спинного мозга отмечен рост активности кальпаина-2 и -1, высокая концентрация кальция в нервной ткани [27, 29, 25, 20, 23]. Нельзя забывать об участии кальпаинов в процессах метастазирования и инвазии опухолей [12, 18]. Результаты показыва-

ют, что для инвазии опухолей человека важна активация кальпаинов, а для снижения метастазирования опухоли необходимо подавление их активности. Не менее важную роль в регуляции неопластических заболеваний играет АТФ-активируемый протеолиз. Известно, что в ходе этого протеолиза АТФ-зависимая протеиназа подвергает расщеплению белок р53, вызывающий апоптоз клеток [21].

Цель исследования – провести анализ изменения активности АТФ- и  $Ca^{2+}$ -зависимых протеиназ перевиваемой культуры глиомы С6 под влиянием глицина.

### Материалы и методы

Культура крысиной глиомы С6 получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Суспензию клеток глиомы С6 плотностью  $10^4 - 10^5$  на 1-10 мл высевали на пластиковые или стеклянные, со специальным покрытием, чашки Петри в синтетическую питательную среду DMEM, содержащую 10% телячьей сыворотки крови, и культивировали в  $CO_2$ -инкубаторе при  $37^\circ C$  в атмосфере 5%  $CO_2$  и 95% воздуха. Через 3 суток количество клеток возрастало в 3-5 раз. Культивирование со сменой среды 1 раз в 3 суток продолжали до получения необходимого количества клеток (маточная культура). Для проведения исследований по изучению влияния глицина на клетки глиомы культуральную среду заменяли на такую же, но содержащую 0,5% сыворотки (дефицитная по белкам крови питательная среда) и использовали для экспериментов. Через сутки в среду вносили глицин в концентрациях 0,1; 1; 10; 25 мМ. По истечении 20 минут, 1 и 3 суток клетки отделяли от кондиционированной среды центрифугированием в течение 5 минут при 2000 об/мин. Активность протеолитических ферментов определяли в пробе клеток по расщеплению казеина, регистрируя накопление

тирозин- и триптофансодержащих кислоторастворимых продуктов [3]. Величину абсорбции определяли при 280 нм с помощью спектрофотометра Cary 100 Bio.

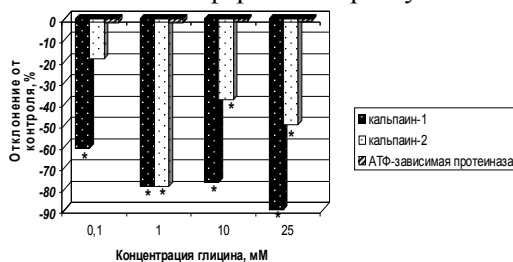
Определение активности ферментов при каждой из концентраций глицина (0,1; 1; 10; 25 мМ) выполняли не менее трёх раз в пяти параллельных образцах. Статистическая значимость полученных результатов была оценена при помощи теста непараметрического анализа (критерий Манна-Уитни) в программе Statistica 6.

#### Результаты и обсуждение

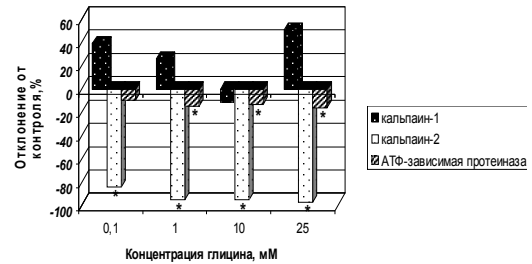
По истечении 20 минут (рисунок 1) внесение глицина во всех испытуемых концентрациях в среду культуры С6 на уровень протеолиза оказало одностороннее действие: наблюдалось сильное угнетение активности кальпаина-1. При этом максимальное падение активности фермента отмечено при максимальной концентрации глицина. Активируемые 14 мМ концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  (кальпаин-2) реакции протеолиза при экспозиции клеток с глицином также угнетались, за исключением минимальной концентрации глицина. Однако наиболее сильное ингибирование кальпаина-2 отмечено при концентрации глицина 1 мМ в питательной среде. Вместе с тем, кратковременная экспозиция клеток культуры С6 с глицином вела к незначительным изменениям интенсивности АТФ-активируемого протеолиза.

При увеличении времени экспозиции до 24 ч изменения активности кальпаина-1 носили иной характер (рисунок 2). Какие-либо существенные изменения в его активности отсутствовали, но можно заметить тенденцию к росту данной протеолитической активности. Во всём диапазоне концентраций глицина наблюдалось сильное угнетение активности кальпаина-2. Однако резкое падение активности отмечено уже при концентрации 0,1 мМ. Оно усиливалось при росте концентрации аминокислоты и достигало 97%.

Что касается интенсивности АТФ-активируемого протеолиза, то суточное влияние глицина в концентрациях 1, 10, 25 мМ вызывало статистически значимое угнетение этого типа протеолиза (рисунок 2). Что позволяет предположить, что 20 минут недостаточно для проявления существенных изменений в активности данного протеолитического фермента под действием исследуемых концентраций глицина. Следует также отметить, что минимальная активность фермента при суточной экс-



**Рисунок 1 - Уровень АТФ- и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого протеолиза при 20-минутном влиянии глицина**  
Примечание: здесь и далее \* - достоверность различий определяли по отношению к контролю ( $P < 0,05$ )



**Рисунок 2 - Уровень АТФ- и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого протеолиза при 1-суточном влиянии глицина**

позиции проявляется при 25 мМ глицина, а максимальная – при 10 мМ.

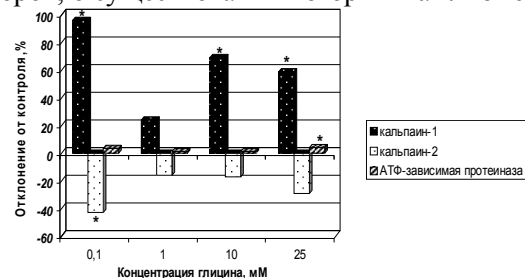
Трёхсуточная экспозиция с глицином на уровень АТФ- и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого протеолиза клеток глиомы С6 оказала разноплановое действие (рисунок 3). При концентрациях 0,1; 10; 25 мМ глицин вызвал сильное увеличение активности кальпаина-1 (96; 69; 59%, соответственно). На активируемые 14 мМ концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  реакции протеолиза глицин оказал противоположный эффект. А что касается АТФ-зависимой протеиназы, то её активность существенно увеличена только при 25 мМ глицина.

Выявленные изменения уровня АТФ- и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого протеолиза клеток глиомы С6 под влиянием глицина позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Добавление глицина в питательную среду культуры глиомы С6 в зависимости от периода экспозиции оказывает разноплановое действие на уровень АТФ- и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого протеолиза.
2. Активность кальпаина-2 снижается при 20 минутном, 1- и 3-суточном влиянии глицина на перерываемую культуру С6.
3. 20-минутное влияние глицина в концентрациях 0,1-25 мМ не оказывает существенных изменений в активности АТФ-зависимой протеиназы.

#### Заключение

Добавление глицина в питательную среду заметно влияет на АТФ- и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемый протеолиз клеток глиомы С6, что, несомненно, связано с изменениями функционально-метаболического статуса этих клеток под действием глицин-опосредованных механизмов. Механизмы такого типа могут быть сопряжены с нарушением функционирования широко представленных у клеток С6 NMDA- и GABA-рецепторов [11], главным коагонистом которых выступает глицин [8, 2]. Не исключена возможность участия в данных протеолитических процессах и собственных глициновых рецепторов, о существовании которых на глиоме С6



**Рисунок 3 - Уровень АТФ- и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого протеолиза при 3-суточном влиянии глицина**

данные литературы отсутствуют. Однако в единичных работах упоминается о наличии собственной глицин-расщепляющей системы в глиальных клетках [28, 24].

В зависимости от времени экспозиции культуры глиомы С6 глицин оказывал разноплановое действие на уровень АТФ- и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого протеолиза. Возможно, это отражает то обстоятельство, что глицин выступает метаболитом очень широкого спектра действия. Именно благодаря способности защищать клетки от действия избытка катехоламинов, глутамата, аспартата и участию в синтезе глутатиона данная аминокислота активно используется при лечении различных нейропатологических состояний.

Известно, что на ряду с дефектными или вовлеченными во многие внутриклеточные процессы (регуляция метаболизма, дифференцировка клеток, контроль клеточного цикла, ответ на стресс и др.) белками [6] мишенью энергозависимого протеолиза в эукариотических клетках является белок p53 [21]. Пониженная активность данного фермента может способствовать развитию апоптоза опухолевых клеток, учитывая наличие у глиомы С6 белка p53 дикого типа. Однако не исключена возможность появления мутированной формы белка p53, способной вызывать противоположный эффект [7].

Нами установлено, что активность кальпаина-2 снижалась при добавлении глицина во всех случаях. Такое выраженное ингибирование активности может приводить к нарушению перестроек цитоскелет-мембранных комплексов [9], процессинга протеинкиназы С и белков рецепторов глутамата [3], изменению клеточного цикла и регуляции метаболических процессов глиомы С6 [1]. Нельзя забывать и о существовании корреляции между активностью кальпаинов и развитием опухоли, её инвазивностью [18]. Исследование этих параметров, несомненно, раскроет ряд неясных сторон в регуляции жизнедеятельности клеток глиомы С6, что, возможно, позволит обосновать подходы к лечению больных при глиозах и глиальных опухолях.

Отличия в поведении двух кальпаинов под действием 20-минутного, 1- и 3-суточного влияния глицина вполне могут быть обусловлены разными физико-химическими свойствами данных протеолитических ферментов (например, кальпаин-1, имея малую молекулярную массу и высокую чувствительность к низким концентрациям  $\text{Ca}^{2+}$ , является более устойчивым к изменению pH и температуры, в отличие от кальпаина-2) [22, 14, 13].

Полученные результаты исследования могут быть использованы в экспериментальной медицине, нейрофизиологии, нейроонкологии, нейрофармакологии, биотехнологии и биологии клетки.

#### Литература

1. Бондарева Л.А., Немова Н.Н., Кийвярайнен Е.И., Токарева Н.П. Внутриклеточные  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые протеиназы млекопитающих // Вестник НАНБ, серия мед. наук. - 2008. - № 1. - С. 64-84.
2. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. - М.: Медицина, 2001. - 328 с.

3. Никандров В.Н., Петрусенко Г.П., Гронская Р.И., Тумилович М.К. Изменение активности АТФ- и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого протеолиза в клетках феохромоцитомы РС12, вызванные воздействием плазминогена и фактора роста нервов // News of biomedical sciences. - 2003. - № 2. - С. 54-58.
4. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Протеолиз как универсальный механизм регуляции биохимических и биологических процессов // Вестник НАНБ, серия мед. наук. - 2008. - № 1. - С. 4-22.
5. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Реализация и регуляция протеолитических процессов на молекулярном и клеточном уровне // Здравоохранение. - 2006. - № 11. - С. 4-9.
6. Роганова Т.В. Энергозависимый селективный внутриклеточный протеолиз. Строение, активные центры и специфичность АТФ-зависимых протеиназ // Вопросы медицинской химии. - 2001. - Т. 47, № 1. - С. 3-19.
7. Царев В.П. Феномен апоптоза и его значение в патологии // Новости биомедицинских наук. - 2002. - № 2. - С. 122-126.
8. Шилов Г.Н., Балаклеевский А.И., Бубель О.Н., Гоголинский В.И. Классификация ГАМК-бензодиазепиновых рецепторов на основе анализа молекулярной геометрии и квантово-химических характеристик основных групп антиконвульсантов // Здравоохранение. - 1997. - № 8. - С. 24-29.
9. Arthur J.S.C., Elce J.S., Hegadorn C. et al. Disruption of the Murine Calpain Small Subunit Gene, *Capn4*: Calpain Is Essential for Embryonic Development but Not for Cell Growth and Division // Molecular and Cellular Biology. - 2000. - Vol. 20. - P. 4474-4481.
10. Banik N.L., McAlhany W.W., Hogan E.L. Calcium-stimulated proteolysis in myelin: Evidence for a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated neutral proteinase associated with purified myelin of rat CNS // J. of Neurochemistry. - 1985. - Vol. 45. - P. 581-588.
11. Brismar T. Physiology of transformed glial cells // Glia. - 1995. - Vol. 15. - P. 231-243.
12. Carragher N.O., Frame M.C. Calpain: a role in cell transformation and migration // Int. J. Biochem. Cell. Biol. - 2002. - Vol. 34, № 12. - P. 1539-1543.
13. Cong J., Goll D.E., Peterson A.M., Kapprell H.-P. The role of autolysis in activity of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent proteinases // The J. of Biological Chemistry. - 1989. - Vol. 264, № 17. - P. 10096-10103.
14. Edmunds T., Nagainis P.A., Sathe S.K. et al. Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of  $\mu$ - and  $m$ -calpain from bovine skeletal muscle // Biochimica et Biophysica Acta. - 1991. - Vol. 1077, № 1. - P. 197-208.
15. Gallant P.E., Pant A.C., Pruss R.M., Gainer H. Calcium-activated proteolysis of neurofilament proteins in the squid giant neuron // J. of Neurochemistry. - 1986. - Vol. 46. - P. 1573-1581.
16. Hiwasa T., Nakata M. et al. Regulation of transformed state by calpastatin via PKCepsilon in NIH3T3 mouse fibroblasts // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2002. - Vol. 290, № 1. - P. 510-517.
17. Lynch G. Memory and the brain: unexpected chemistries and a new pharmacology // Neurobiol. Learning Memory. - 1998. - Vol. 70. - P. 82-100.
18. Mamoune A., Luo J.H., Lauffenburger D.A., Wells A. Calpain-2 as a target for limiting prostate cancer invasion // Cancer Res. - 2003. - Vol. 63, № 15. - P. 4632-4640.
19. Poussard S., Cottin P., Brustis J. J. et al. Quantitative measurement of calpain I and II mRNAs in differentiating rat muscle cells using a competitive polymerase chain reaction method // Biochimie. - 1993. - Vol. 75, № 10. - P. 885-890.
20. Saatman K., Murai H., Bartus R. et al. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat // Proc. Natl. Acad. Sci. - 1996. - Vol. 93. - P. 3428-3433.
21. Sadoul R., Fernandez P.A., Quiquerez A.L. et al. Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons // EMBO J. - 1996. - Vol. 15. - P. 3845-3852.
22. Saido T.C., Shibata M., Takenawa T. et al. Positive regulation of  $\mu$ -calpain action by polyphosphoinositides // The J. of Biological Chemistry. - 1992. - Vol. 267, № 34. - P. 24585-24590.
23. Samantaray S., Knaryan V.H., Guyton M.K. et al. The Parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of lewis rats // Neuroscience. - 2007. - Vol. 146, № 2. - P. 741-755.
24. Sato K., Yoshida S., Fujiwara K. et al. Glycine cleavage system in astrocytes // Brain Res. - 1991. - Vol. 567. - P. 64-70.
25. Shields D., Schaecher K., Saido T. A putative mechanism of demyelination in multiple sclerosis by a proteolytic enzyme, calpain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1999. - Vol. 96. - P. 11486-11491.
26. Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K. Structure and physiological function of calpains // Biochem. J. - 1997. - Vol. 328. - P. 721-732.
27. Tsuji T., Shimohama S., Kimura J., Shimizu K. m-Calpain (calcium-activated neutral proteinase) in Alzheimer's disease brains // Neurosci. Lett. - 1998. - Vol. 248. - P. 109-112.
28. Verleysdonk S., Martin H., Willker W. et al. Rapid uptake and degradation of glycine by astroglial cells in culture: Synthesis and release of serine and lactate // Glia. - 1999. - Vol. 27. - P. 239-248.
29. Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates // Prog. Neurobiol. - 2000. - Vol. 62. - P. 273-295.
30. Yoshikawa Y., Mukai H., Hino F. et al. Isolation of two novel genes, down-regulated in gastric cancer // Jpn. J. Cancer Res. - 2000. - Vol. 91. - P. 459-463.

Поступила 08.04.09