

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРЕ НЕРВНОЙ ТКАНИ****Н.И. Чалисова, В.Х. Хавинсон***Институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург***INVESTIGATION OF CYTOKINES IN TISSUE CULTURE****N.I. Chalisova, V.Kh. Khavinson***Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg*

Many of the neurotrophic factors (NTF) that were recently discovered promote the survival, growth, and neurite differentiation of sensory neurons. The most known NTF is the nerve growth factor (NGF), its high concentration is known in submandibular salivary glands of mammalia, reptilia and other animal species and in mesenchimal tissues. All NTF s are known to be specific proteins with low molecular weight. The chick embryo dorsal root ganglia (DRG) has been used to devise a rapid assay for many NTF s.

Nerve growth factor level was elevated both in the cerebrospinal fluid of epileptic patients and in the media of cocultures of rat hippocampus and chick embryo sensory neurons after veratridine treatment. The epileptiform agent - veratridine - gave rise elevation of the neurotrophic factors level in the culture media and neurite outgrowth of dorsal root ganglia sensory neurons. The cerebrospinal fluid from patients with epilepsy stimulated an extensive neurite growth in the organotypic culture of chick embryo sensory neurons. The anti-NGF antibodies were shown to block the neurite-stimulating effect of the cerebrospinal fluid. These results indicate that the epileptiform activity of neurons evokes the expression of neurotrophins. NTF can be used for treatment of neurodegenerative deseases.

The natural brain peptides-cortexin and epithalamin — and synthetic tetrapeptides-brain peptide and epiphysis peptide-were used to investigate its effect on organotypic culture of dorsal root ganglia (DRG) neurons and explants of brain tissue of 10-11 day old chick embryo. The concentration of cortexin 2-100 ng/ml, of epithalamin 200 ng/ml, of brain peptide 2 ng/ml and of epiphysis peptide 20 ng/ml showed neurite-stimulating effect in DRG culture as compared to the control explants. The concentration of cortexin 100 ng/ml and of brain peptide 20 ng/ml showed stimulating effect in cortex culture, and the concentration of epithalamin 200 ng/ml and of epiphysis peptide 100 ng/ml showed the stimulating effect in subcortex structures culture as compared to the control.

В настоящее время в нейробиологии и медицине большое внимание уделяется классу биологически активных веществ — цитокинам, которые часто называют также ростовыми факторами. К ним относятся факторы роста фибробластов, трансформирующие факторы роста, большая группа интерлейкинов, а также нейротрофины и цитомедины.

Последние две группы представляются очень перспективными для использования в клинической практике.

Наиболее адекватным методом исследования биологически активных веществ в эксперименте является культура ткани, когда становится возможным строго дозированное воздействие на ткань исследуемых препаратов. При этом исключаются действующие в целостном организме гуморальные, нервные, гормональные и другие влияния. Культивирование тканей проводится в строго стерильных условиях, в специально подобранных питательных средах, при температуре 36,7°C. В культуре нервной ткани, по интенсивности роста нейритов, можно четко проследить стимулирующее или ингибирующее действие того или иного фактора. В использованной нами в течение ряда лет модели органотипического культивирования нервной ткани, (т.е. с сохранением структурной организации фрагмента ткани), получены результаты, позволяющие не только раскрывать механизмы действия нейротрофинов и цитомединов, но и в дальнейшем рекомендовать применение их при диагностике и лечении патологических состояний нервной системы [2, 3, 6, 7, 8]. Нейротрофические факторы (НТФ) — это низкомолекулярные белки, эпигенетически определяющие выживание нейронов в эмбриогенезе и поддержание их морфо-функциональных свойств во взрослом организме. Наиболее известными НТФ являются фактор роста нервов (ФРН), производный из мозга НТФ (ПМНТФ), нейротрофины 3, -4, -5 [2, 10, 16]. НТФ локализованы в сердце, печени, почках, надпочечниках, селезенке, плаценте, скелетных мышцах, подчелюстных слюнных железах, в опухолях глиальной природы, т.е. в тканях мезенхимной природы с высокой пролиферативной активностью [4, 11, 16]. Кроме того высокое содержание ФРН обнаружено не только в периферической глие, но и в глиальных клетках центральной нервной системы, особенно в астроцитах [11, 15]. Таким образом выявилось большое содержание ФРН, а также ПМНТФ, цилиарного НТФ в тканях головного мозга.

Под влиянием НТФ в компетентных для их действия нейронах происходит увеличение анаболической активности, синтеза нейротрансмиттеров и медиаторных энзимов, увеличивается продукция структурных белков, которые и служат материалов для растущих нейритов.

Одним из путей влияния ФРН на клетки-мишени является его взаимодействие со специализированными рецепторами на поверхности мембранны сомы нейронов. Существует два типа ФРН-рецепторов, отличных по кинетическим параметрам [11, 14]. Низкоаффинное связывание фактора опосредовано через 75-к-гликопротеин — низкоаффинный рецептор к ФРН (LNGFR). Нейротрофические факторы опосредуются при связывании с высокояффинным рецептором 140-к-тиrozинпротеинкиназой, кодируемой прото-онкогеном trk. Предполагают, что ФРН и другие нейротрофические факторы при взаимодействии с рецепторами активируют системы вторичных посредников. Так показано, что ранние эффекты ФРН могут опосредоваться протеинкиназой-C. Однако, этого недостаточно для дальнейшей нейрональной дифференцировки. Вероятно, далее активируется другой биохимический путь, через аденилатциклазу. Высокояффинный рецептор к ФРН (HNGFR или p140<sup>trkA</sup>) является представителем класса рецепторов, для которых характерна тирозинкиназная активность. При связывании с лигандом происходит активация киназной активности и аутофосфорилирование рецептора. То, что киназная активность p140<sup>trkA</sup> значительно усиливается при взаимодействии с ФРН говорит о несомненном участии p140<sup>trkA</sup> в индуцируемых фактором событиях сигнальной трансдукции [11, 14, 17]. Видимо, высокояффинное связывание вызывает димеризацию рецепторов и их активацию. При этом активируется путь сигнальной трансдукции и запускается каскад фосфорилирования [14].

Полагают, что p75<sup>NGFR</sup> и p140<sup>trkA</sup> оказывают влияние друг на друга. В этом случае, вероятно, связывание ФРН с p75 может вести к посттрансляционной модификации p140 или самого p75 и к модификации его способности связывать ФРН. Однако, p140 опосредует биологическое действие ФРН в отношении фибробластов и РС 12 клеток линии в отсутствии p75 [11, 14].

В головном мозгу ФРН влияет не на адренергические, как на периферии, а на холинергические нейроны базального переднего мозга. ФРН и мРНК ФРН найдены в различных областях головного мозга, с наибольшей концентрацией в гиппокампе и неокортике, т.е. в тканях-мишениях, иннервируемых холинергическими нейронами, расположенными в базальной области переднего мозга [15]. Показано, что холинергические нейроны этой области могут захватывать своими терминалями и транспортировать с ретроградным аксоноплазматическим током ФРН из тканей-мишений [11, 15]. Перерезка холинергических путей приводила к нарушению аксоноплазматического тока и накоплению ФРН дистально от перерезки в тканях-мишениях. При восстановлении холинергических контактов с гиппокампом уровень ФРН возвращался к исходному. Это явление по механизму аналогично увеличению уровня ФРН в денервированных тканях при симпатэктомии у взрослых животных [15]. Кроме того показано, что фимбриэктомии (пересечении главного холинергического входа в гиппокамп) часть холинергических

нейронов переднего мозга гибнет. Однако, если вводить при этом в желудочки головного мозга ФРН, то нейроны выживают.

Известно, какую большую роль играет передний мозг в осуществлении высшей нервной деятельности — процессах обучения, памяти, пластичности, т.е. во всем комплексе адаптационных реакций нервной системы. Поэтому несомненна зависимость этих сложных процессов от уровня различных биологически активных веществ в тканях переднего мозга, в том числе от уровня НТФ. Действительно, появились экспериментальные данные о том, что введение ФРН в желудочки и ткани мозга действует как модификатор процессов обучения, улучшая их. Так при введении ФРН в супрахиазматическое ядро усиливалось пищевое поведение крыс и хорьков. Стальным крысам в желудочки мозга вводили ФРН и у них увеличивалось количество и размеры холинергических нейронов, а водный тест Мориса становился таким же, как у молодых животных, т.е. улучшалось обучение [19]. Если мышам линии «ускоренного старения» вводили фактор роста фибробластов, обладающий нейротрофическими свойствами, то у животных не наблюдалось потери холинергических нейронов в стриатуме с снижения активности холин ацетил трансферазы, а также улучшалось обучение [12]. При введении в средний мозг крысам ПМНТФ улучшалась реакция избегания, все локомоторное поведение, а кроме того на 70% сокращалось время неподвижности животных, т.е. данный НТФ действовал как антидепрессант [20]. Вовлечение НТФ в контроль поведения доказывается также тем, что введение ФРН в ретикулярную формацию ствола головного мозга кошки вызывало активный сон. При развитии психосоциального стресса у крыс отмечалось повышение уровня ФРН в сыворотке крови [2].

Большой прогресс в изучении НТФ ведет к пониманию того, каким образом эти белки могут использоваться при лечении нейродегенеративных заболеваний т.е. улучшить адаптационные свойства нервной системы при таких заболеваниях, которые не поддаются никаким другим методам лечения. Этими нейродегенеративными заболеваниями являются болезни Альцгеймера, Паркинсона, Лу Геринга (боковой амиотрофический склероз). Показано, что при болезни Альцгеймера как раз страдают магноцеллюлярные холинергические нейроны, а в ткани мозга на 50% снижается уровень ФРН, ПМНТФ. Поэтому для лечения используют введение ФРН в желудочки головного мозга и состояние больных при этом улучшается [15]. Увеличение выживаемости допаминергических нейронов при действии ПМНТФ используется при лечении болезни Паркинсона. У 720 больных боковым амиотрофическим склерозом наблюдалось улучшение при применении цилиарного НТФ. Полупериод жизни НТФ в кровотоке 3 минуты, поэтому необходимо вводить их непосредственно в цереброспинальную жидкость (ЦСЖ), чтобы они достигли нейроны. Однако катетеры, вживленные в головной мозг создают опасность инфицирования, поэтому в настоящее время

начинают использовать имплантацию в ткань мозга и основание позвонков полимеразных капсул, содержащих необходимые НТФ. Другим подхodom является взятие клеток кожи больного, в которых ~~наиболее~~ содержатся диффузия генетической информации, для пропагандирования НТФ, и последующая имплантация этих клеток в мозг больного.

Таким образом, большое содержание НТФ в головном мозгу позволяет говорить о наличии альтернативной «парасинаптической» передачи в мозгу с помощью диффузии НТФ через внеклеточную жидкость, которая занимает около 20% объема мозга [11]. Диффузия НТФ в межклеточное пространство обеспечивает их скопление в ЦСЖ, которая представляет собой естественный коллектор всех метаболитов мозга. Поэтому представляется перспективным исследование уровня нейротрофической активности ЦСЖ при различных патологических состояниях нервной системы, определяющей ее функциональную активность и способствующей ее восстановлению.

Имеются сведения, что эпилептиформная судорожная активность в головном мозгу сопровождается повышением экспрессии мРНК ФРН, ПМНТФ, цилиарного НТФ в гиппокампе и коре головного мозга. При исследовании нами, в органотипической культуре спинномозговых ганглиев, ЦСЖ больных с эпилепсией или судорожными припадками ~~после парентерального инцефалита~~ выявлено, что у 96% больных имеется значительное повышение нейротрофической активности ЦСЖ по сравнению с контролем [9]. Введение в культуру нервной ткани наряду с ЦСЖ антител к ФРН снижало нейротрофическую активность на 45%, т. е. часть нейротрофической активности ЦСЖ была обусловлена содержанием в ней ФРН.

Полученные факты можно понять с точки зрения патологических изменений (нарушение белкового, энергетического обмена, дыхательной функции) в нейронах при эпилептогенезе. Известно, что патологический процесс идет по рецессивному пути развития, приближаясь по многим своим характеристикам к эмбриональным. А именно в период эмбриогенеза нервные клетки наибо-

~~льее~~ в развитии. В это время в результате нарушения нервных клеток выработка НТФ увеличивается по типу адаптивного компенсаторного механизма. Так НТФ участвуют в адаптации центральной нервной системы к патологическим условиям. Данные об изменении уровня НТФ при судорожной активности, при стрессе, свидетельствуют о влиянии нейрональной активности на экспрессию НТФ. В свою очередь НТФ действуют как протекторные вещества при повышении возбудимости нейрона.

Большое внимание уделяется в настоящее время также цитомедианам — пептидным биорегуляторам, поддерживающим структурный и функциональный гомеостаз клеточных популяций, которые содержат и продуцируют этот фактор [5, 6]. Результаты экспериментальных и клинических исследований показывают, что комплексное применение пепти-

дов тимуса, эпифиза, коры головного мозга позволяет «замедлить ход биологических часов» в организме, уменьшить частоту возникновения опухолей и болезней, связанных со старением. Поэтому цитомедианы успешно используются в терапии практической практике [6, 7].

Нами были исследованы в культуре нервной ткани препараты кортексина и эпигаламин, выделенные соответственно из коры головного мозга и эпигаламуса крупного рогатого скота и содержащие комплекс полипептидных фракций [6]. Так же в культуре ткани исследовались искусственно сконструированные тетрапептиды — из коры головного мозга и эпифиза [7].

Изучали влияние кортексина, эпигаламина и тетрапептидов на рост отростков чувствительных нейронов и на развитие фрагментов коры и подкорковых образований головного мозга 10-11-суточных мышей змейки в органотипической культуре.

Кортексин в дозе 2-10 нг/мл, эпигаламин в дозе

200 нг/мл, пептид мозга в дозе 2 нг/мл, тетрапепти-

ды в дозе 1 нг/мл обладают стимулирующее влияние, что обнаруживалось на 3-и сутки культивирования спинномозговых ганглиев. При добавлении в культуральную среду эксплантов коры головного мозга кортексина в дозе 100 нг/мл и пептида мозга в дозе 20 нг/мл обнаружена стимуляция развития эксплантов. Та же доза кортексина в культуральной среде эксплантов подкорковых образований подавляла их развитие. Эпигаламин в дозе 200 нг/мл и пептид эпифиза в дозе 100 нг/мл стимулировали развитие эксплантов подкорковых образований. Возможно, в стимулирующем и ингибирующем эффектах кортексина и эпигаламина играет роль наличие в препаратах нейротрофических факторов, а искусственно сконструированные тетрапептиды обладают непосредственным стимулирующим действием на соответствующие ткани. Полученные данные открывают перспективы использования не только экстрагированных препаратов (содержащих несколько фракций пептидов), но и искусственно сконструированных пептидов для лечения ряда заболеваний центральной нервной системы в гериартической практике.

Таким образом исследование в культуре ткани нейрональных клеток может не только влиять на процессы регенерации и пластичности нервной ткани, что открывает перспективы внедрения этих факторов роста в клиническую практику для лечения патологии центральной и периферической нервной системы.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Акоев Г.Н., Чаликова Н.И. Нейротрофические факторы из ЦНС//Успехи физiol. наук.- 1990.- Т. 21.- № 4.- С. 138-142.
- Горбунова Н.Б., Калюнов В.Н. Фактор роста нервов при различных видах стресса в эксперименте//Известия АН БССР.- 1993.- № 3.- С. 85-89.
- Гончарова В.П., Чаликова Н.И., Романюк А.В. и др. Нейрит-стимулирующее действие в культуре ткани белка, выделенного из лизосомальной фракции ткани мозга//Докл. АН СССР.- 1985.- Т. 285.- № 5, С. 1238-1241.