

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА КЛЕТКИ НЕРВНОЙ ТКАНИ IN VITRO

© В. Х. Хавинсон, В. Г. Морозов, Н. И. Чалисова, В. Б. Окулов

Институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург

Исследовали влияние кортексина и эпителамина на рост отростков чувствительных нейронов и на развитие фрагментов коры и подкорковых образований головного мозга 10—11-суточных куриных эмбрионов в органо-типической культуре. Кортексин в дозах 20 и 100 нг/мл, а эпителамин в дозах 20 и 200 нг/мл оказывали нейритстимулирующее влияние, что обнаруживалось на 3-и сут культивирования спинномозговых ганглиев. При добавлении кортексина в культуральную среду эксплантов коры головного мозга в дозе 100 нг/мл обнаружена стимуляция развития эксплантов. Та же доза кортексина в культуральной среде эксплантов подкорковых образований подавляла их развитие. Эпителамин в дозе 200 нг/мл стимулировал развитие эксплантов подкорковых образований. Возможно, в стимулирующих и ингибирующем эффектах кортексина и эпитеталамина играет роль наличие в препаратах нейротрофических факторов.

В нейробиологии и медицине большое внимание уделяется в настоящее время нейротрофическим факторам (НТФ), которые впервые были обнаружены два десятилетия тому назад. НТФ являются низкомолекулярными белками (15—30 кДа), выделяются из иннервируемых тканей-мишеней и необходимы как для выживания и дифференцировки нейронов во время эмбриогенеза, так и для поддержания морффункциональных свойств зрелых клеток (Bard et al., 1980; Levi-Montalchini, 1982; Thoenen et al., 1983; Barbin et al., 1984). Наиболее изученными и очищенными до гомогенного состояния являются НТФ, принадлежащие к семейству нейротрофинов: фактор роста нервов, производный из мозга НТФ, и нейротрофины-3, -4, -5. Часть НТФ вырабатывается самими нервными клетками по аутокринному типу (Elde et al., 1991). В центральной нервной системе они продуцируются пирамидными клетками и гранулярными нейронами гиппокампа и ретроградным путем поступают в область базального мозга (Ernfors et al., 1990). Кроме того, большое количество НТФ вырабатывается глиальными клетками головного мозга — астроцитами (Ebendal, 1992), а также секretируется аденоцитом (Borson et al., 1991).

Классическим тест-объектом для биотестирования нейротрофической активности является органотипическая культура спинномозговых ганглиев (Levi-Montalchini, 1982). Чувствительные нейроны этих ганглиев отвечают усилением роста нейритов на введение в культуру наномолярных концентраций НТФ.

Различные препараты, получаемые из ткани головного мозга, могут содержать НТФ. Для выполнения исследования нами были использованы препараты кортексин и эпителамин, выделенные соответственно из коры головного мозга и эпителамуса крупного рогатого скота и содержащие комплекс полипептидных фракций (Морозов, Хавинсон, 1993). Ранее нейротрофические свойства этих препаратов не исследовались.

Для изучения непосредственного влияния кортексина и эпителамина на развитие нервной ткани было проведено исследование их в культуре нервной ткани, когда исключаются реакции целостного организма. Тогда становится возможным выделить стимулирующие или угнетающие эффекты препаратов в отношении отдельных фрагментов периферической и центральной нервной системы.

Целью работы было изучение развития эксплантов периферической и центральной нервной системы в органотипической культуре ткани в присутствии эффективных концентраций кортексина и эпителамина.

Материал и методика

Эксперименты проведены на 250 эксплантах спинномозговых ганглиев и 200 фрагментах коры головного мозга и подкорковых образований 10—11-суточных эмбрионов цыпленка по методике, описанной ранее (Чалисова и др., 1991). Питательная среда для культивирования эксплантов состояла их 35 % раствора Игла, 25 % фетальной сыворотки теленка, 35 % раствора Хенкса и 5 % куриного эмбрионального экстракта; в среду добавляли глюкозу (0.6 %), инсулин (0.5 ед./мл), пенициллин (100 ед./мл) и глютамин (2 mM). В эту среду помещали или спинномозговые ганглии куриних эмбрионов, или фрагменты коры головного мозга, или фрагменты подкорковых образований. Ганглии культивировали на подложке из коллагена, во вращающихся пробирках, в термостате при 36.7° С в течение 3 сут. Фрагменты центральной нервной системы культивировали в чашках Петри, в термостате при 36.7° С в течение 2 сут. В экспериментальную среду добавляли кортексин и эпителамин (производство малого предприятия Института биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург) в концентрациях 2, 20, 50, 100, 200, 400, 800 и 1000 нг/мл. Критерием биологической активности служил индекс площади (ИП) — отношение площади всего экспланта вместе с зоной роста к исходной площади ганглия или фрагмента мозга. Достоверность различия сравниваемых средних значений ИП оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения ИП выражали в процентах, контрольное значение ИП принималось за 100 %.

Результаты

При развитии контрольных эксплантов спинномозговых ганглиев, в культуральную среду которых не добавляли кортексин и эпителамин, происходило их распластывание на коллагеновой подложке, вокруг них выявлялись 2 зоны. Центральная зона состояла из немигрирующих дифференцирующихся нейробластов, а периферическая — из множества аксонов, растущих по окружности ганглия во всех направлениях. Рост аксонов сопровождался выселением пролиферирующих клеток-сателлитов и фибробластоподобных клеток, что приводило к образованию характерного ореола вокруг ганглия (рис. 1; см. вкл. VII).

Зону роста эксплантов коры и подкорковых образований составляли более короткие, чем в экспланатах спинномозговых ганглиев, нейриты, а также выселяющиеся клетки глии, фибробластоподобные клетки.

На 3-и сут культивирования отчетливо наблюдался нейритстимулирующий эффект кортексина при двух концентрациях: при концентрации 20 нг/мл, когда ИП эксплантов спинномозговых ганглиев был на $123 \pm 7\%$ ($n = 8$, $P < 0.05$) выше контрольного значения ИП ($n = 10$), а также при концентрации 100 нг/мл, когда ИП экспланата был на $73 \pm 2\%$ ($n = 12$, $P < 0.05$) выше контрольного значения ИП (рис. 2). Уменьшение нейритстимулирующей активности кортексина при концентрации 50 нг/мл и дальнейший подъем этой активности при 100 нг/мл могут быть связаны с наличием в препарате двух типов полипептидов, что будет обсуждаться ниже.

При исследовании развития эксплантов спинномозговых ганглиев в присутствии эпителамина достоверный нейритстимулирующий эффект достигался также при двух концентрациях: при концентрации 20 нг/мл, когда ИП экспланата был на $12 \pm 2\%$ ($n = 16$, $P < 0.05$) выше контрольного значения ИП, при концентрации 200 нг/мл — на $28 \pm 8\%$ ($n = 15$, $P < 0.05$) выше контрольного значения ($n = 12$) (рис. 3).

Таких два пика нейритстимулирующей активности у обоих препаратов могут быть связаны с наличием в каждом препарате двух типов нейритстимулирующих полипептидов в различных эффективных концентрациях.

Отчетливо наблюдались дозозависимые эффекты при каждом пике эффективной концентрации. При концентрации кортексина 2 и 50 нг/мл наблюдается меньший нейритстимулирующий эффект, чем при концентрации 20 нг/мл, а при концент-

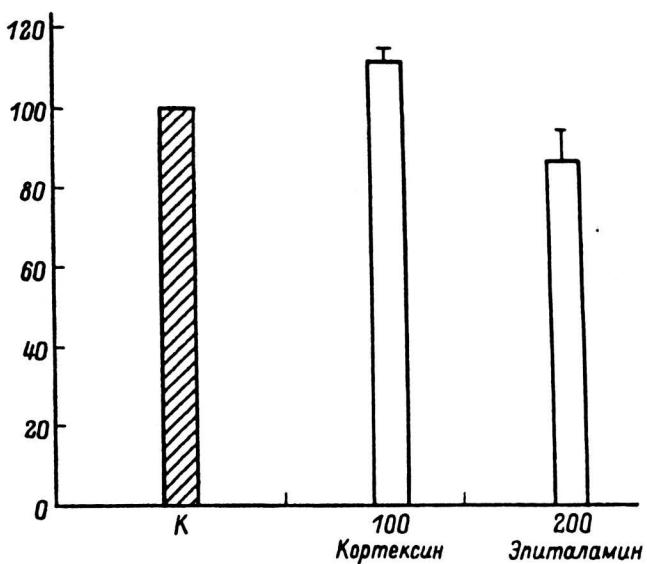


Рис. 4. Влияние кортексина и эпиталамина на развитие эксплантов коры головного мозга куриных эмбрионов.

По горизонтали — концентрация препаратов, нг/мл; по вертикали — индекс площади эксплантата, %. К — контрольные экспланты коры головного мозга. Вертикальные отрезки — 95%-ные доверительные интервалы средних значений.

которая являлась эффективной при развитии эксплантов спинномозговых ганглиев, наблюдалось достоверное повышение ИП эксплантов на $12 \pm 2\%$ ($n = 14$, $P < 0.05$) по сравнению с контрольными значениями ИП ($n = 9$). Достоверных различий ИП эксплантов коры при действии других концентраций кортексина не наблюдалось (рис. 4), в том числе и при концентрации 20 нг/мл, которая была эффективной для первого пика нейритстимулирующей активности в культуре спинномозговых ганглиев. Различные концентрации эпиталамина, в том числе эффективные в отношении спинномозговых ганглиев, не вызывали достоверных различий в ИП эксплантов коры головного мозга (рис. 4).

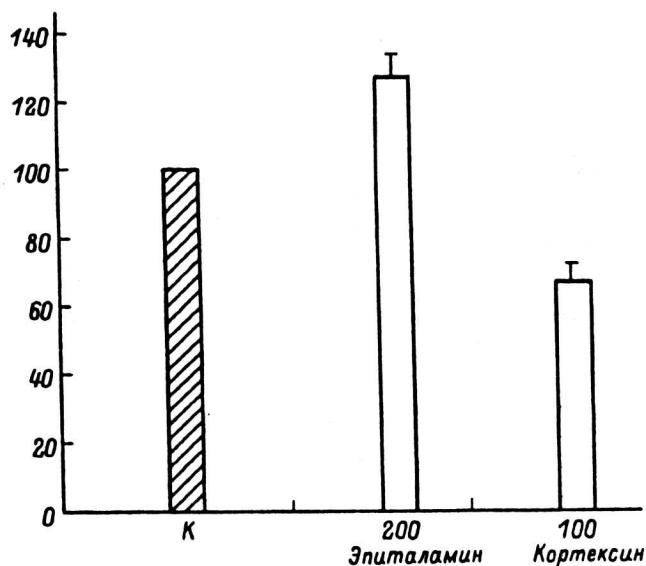


Рис. 5. Влияние кортексина и эпиталамина на развитие эксплантов подкорковых образований мозга куриного эмбриона.

По горизонтали — концентрация препаратов, нг/мл; по вертикали — индекс площади эксплантата, %. К — контрольные экспланты подкорковых образований. Вертикальные отрезки — 95%-ные доверительные интервалы средних значений.

В серии опытов культивировались фрагменты подкорковых образований головного мозга эмбриона цыпленка. При добавлении к таким эксплантатам эпителамина в концентрации 200 нг/мл (которая являлась эффективной в отношении спинномозговых ганглиев), наблюдалось достоверное увеличение ИП на $27 \pm 3\%$ ($n = 15$, $P < 0.05$) по сравнению с контрольными ИП ($n = 15$). Эпителамин в других концентрациях, в том числе и в концентрации 20 нг/мл, не оказывал стимулирующего влияния на развитие эксплантатов подкорковых образований (рис. 5). При добавлении в культуральную среду кортексина в различных концентрациях выявился ингибирующий его эффект в концентрации 100 нг/мл. Эта концентрация была эффективной для стимуляции развития эксплантатов спинномозговых ганглиев и коры. Однако при действии на подкорковые образования кортексина в концентрации 100 нг/мл происходило уменьшение ИП эксплантатов на $33 \pm 2\%$ ($n = 11$, $P < 0.05$) по сравнению с контрольными значениями ИП ($n = 9$) (рис. 5).

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что в кортексине имеется фракция пептидов, стимулирующих развитие коры головного мозга, а в эпителамине содержится фракция пептидов, положительно влияющих на развитие подкорковых образований головного мозга. Можно предположить, что в осуществлении этого стимулирующего эффекта играют роль НТФ. Можно полагать, что содержащиеся в кортексине и эпителамине НТФ оказывают нейритстимулирующий эффект в организованной культуре спинномозговых ганглиев цыпленка. Косвенным подтверждением этого может служить тот факт, что НТФ не обладает видоспецифичностью, поэтому препараты, полученные из мозга млекопитающих, могли оказывать стимулирующее влияние на спинномозговые ганглии и фрагменты головного мозга других видов животных.

Из двух пиков эффективных концентраций в отношении спинномозговых ганглиев только один пик эффективной концентрации каждого препарата давал стимулирующий эффект в отношении тканей головного мозга. Причем это были значения 100 нг/мл кортексина и 200 нг/мл эпителамина, т. е. больше, чем значения первого пика, эффективного в отношении спинномозговых ганглиев концентрации (20 нг/мл). Видимо, эффективная в отношении ткани центральной нервной системы концентрация НТФ лежала в диапазоне 100—200 нг/мл, что соответствует данным об эффективной концентрации такого НТФ, как фактор роста нервов (Levi-Montalchini, 1982; Ebendal, 1992). Для дальнейшего детального выявления содержания НТФ в кортексине и эпителамине необходимы исследования с использованием антител к НТФ, содержащимся в тканях центральной нервной системы. Обнаруженное в экспериментах в культуре нервной ткани отчетливое действие кортексина и эпителамина может служить основанием для практического применения данных пептидов при нейродегенеративных заболеваниях.

Список литературы

- Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем — цитомедины // Успехи соврем. биологии. 1983. Т. 96, № 3 (6). С. 339—346.
Чалисова Н. И., Мелькишев В. Ф., Акоев Г. Н., Людяно М. И., Куренкова Т. Ю. Стимулирующее влияние пролактина на рост нейритов чувствительных нейронов в организованной культуре // Цитология. 1991. Т. 33, № 2. С. 29—31.
Barbit B., Manthorphe M., Varon S. Purification of the chick eye ciliary neurotrophic factor // J. Neurochem. 1984. Vol. 43. P. 1468—1478.
Bardé Y., Edgar D., Thoenen H. Sensory neurons in culture. Changing requirements for survival factors during embryonic development // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. Vol. 77. P. 1199—1203.