

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ЦИТОМЕДИНОВ В КУЛЬТУРЕ НЕРВНОЙ ТКАНИ

В.Х.Хавинсон, Н.И.Чалисова, В.Б.Окулов

Институт биорегуляции и геронтологии (рук. — докт. мед. наук проф. В.Х.Хавинсон), Санкт-Петербург

Исследовали влияние кортексина, эпителамина, полипептидов из коры головного мозга и эпифиза (пептид мозга и пептид эпифиза) на рост отростков чувствительных нейронов и на развитие фрагментов коры и подкорковых образований головного мозга 10-11-суточных куриных эмбрионов в органотипической культуре. Препараты в дозах 2-200 нг/мл оказывали нейритстимулирующее 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. Эпителамин в дозе 200 нг/мл и пептид эпифиза в дозе 100 нг/мл стимулировали развитие эксплантов подкорковых образований. Возможно использование стимулирующего действия препаратов для усиления процессов регенерации нейритов.

Ключевые слова: *пептиды мозга, культура нервной ткани*

В нейробиологии и медицине большое внимание уделяется цитомединам — пептидным биорегуляторам, поддерживающим структурный и функциональный гомеостаз клеточных популяций, которые содержат и продуцируют этот фактор [1]. Классическим тест-объектом для тестирования биологически активных веществ является органотипическая культура спинномозговых ганглиев (СМГ) [4,7,8]. Чувствительные нейроны этих ганглиев отвечают усилением роста нейритов на введение в культуру наномолярных концентраций активных белковых препаратов.

Исследовали препараты кортексин и эпителамин, выделенные, соответственно, из коры головного мозга и эпитеталамуса крупного рогатого скота и содержащие комплекс полипептидных фракций, а также искусственные полипептиды — аналоги биологически активных пептидов из коры головного мозга (пептид мозга) и эпифиза (пептид эпифиза), свойства которых до сих пор не изучены.

Исследование непосредственного влияния изучаемых препаратов на развитие нервной ткани с использованием метода культуры ткани позволяет исключить реакции целостного организма. Тогда становится возможным определить 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 указанных препаратов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 350 эксплантах СМГ и 250 фрагментах коры головного мозга и подкорковых образований 10-11-суточных эмбрионов цыпленка по методике [2]. Питательная среда для культивирования эксплантов состояла из 35% раствора Игла, 25% фетальной сыво-

воротки теленка, 35% раствора Хенкса, 5% куриного эмбрионального экстракта, в среду добавляли глюкозу (0.6%), инсулин (0.5 ЕД/мл), пенициллин (100 ЕД/мл) и глутамин (2 мМ). В эту среду помещали или СМГ куриных эмбрионов, или фрагменты коры головного мозга, или фрагменты подкорковых образований. СМГ культивировали на подложке из коллагена во вращающихся пробирках в термостате при 36.7°C в течение 3 сут. Фрагменты центральной нервной системы культивировали в чашках Петри в термостате при 36.7°C в течение 2 сут. В экспериментальную среду добавляли кортексин, эпителамин, пептид мозга, пептид эпифиза в концентрациях 0.5, 1, 2, 20, 50, 100, 200, 400, 800 и 1000 нг/мл. Критерием биологической активности служил индекс площади (ИП) — соотношение площади всего эксплантата 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 принимали за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При развитии контрольных эксплантатов СМГ, в культуральную среду которых исследуемые препараты не добавляли, происходило их расплетывание 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).

Зону роста эксплантатов коры и подкорковых образований составляли более короткие, чем в эксплантатах СМГ, нейриты, а также выселяющиеся клетки глии — фибробластоподобные клетки.

На 3-и сутки культивирования отчетливо наблюдался нейритстимулирующий эффект (НСЭ) кортексина при концентрациях 2-100 нг/мл, когда ИП эксплантатов СМГ был в среднем на 70% выше ИП контрольных эксплантатов. Особенно выраженный НСЭ наблюдался, например, при концентрации кортексина 20 нг/мл, когда ИП был на 123±7% ($n=18$, $p<0.05$) выше контрольного значения ИП ($n=15$, рис. 2). Уменьшение НСЭ 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.

При исследовании развития эксплантатов СМГ в присутствии эпителамина достоверный НСЭ достигался при концентрации 200 нг/мл, когда ИП был на 28±8% ($n=19$, $p<0.05$) выше контрольного значения ($n=17$, рис. 2).

Отчетливо наблюдались дозозависимые эффекты при каждом пике эффективной концентрации исследуемых препаратов. Концентрации кортексина 2, 10 и 50 нг/мл давали меньший НСЭ, чем концентрация 20 нг/мл, а концентрации 50 и 200 нг/мл давали меньшие значения ИП эксплантатов, чем 100 нг/мл (рис. 2).

Эпителамин в концентрациях 2 и 50 нг/мл вызывал меньший НСЭ по сравнению с концентрацией 20 нг/мл. Концентрации 100 и 400 нг/мл давали меньший НСЭ по сравнению с эффективной концентрацией эпителамина 200 нг/мл (рис. 2).

Эффективная концентрация пептида мозга оказалась чрезвычайно малой — 2 нг/мл, однако ИП эксплантатов на 40±5% ($n=25$, $p<0.01$) превышал ИП контрольных эксплантатов. Концентрации пептида 0.5 и 1 нг/мл не давали НСЭ, а концентрации свыше 10 нг/мл вызывали угнетение роста нейритов (рис. 2).

Пептид эпифиза также обладал эффективной концентрацией в очень узком диапазоне — 20 нг/мл, превышение ИП опытных эксплантатов составляло 40±9% ($n=16$, $p<0.05$), остальные концентрации препарата НСЭ не давали (рис. 2).

При исследовании непосредственного влияния препаратов на ткани центральной нервной системы были поставлены следующие серии опытов. В питательную среду эксплантатов коры головного мозга эмбрионов цыплят добавляли кортексин в различных концентрациях. При концентрации 100 нг/мл, которая являлась эффективной при развитии эксплантатов СМГ, наблюдалось достоверное повышение ИП эксплантатов на 30±2% ($n=21$, $p<0.05$) по сравнению с контрольными значениями ИП ($n=18$). Достоверных различий ИП эксплантатов коры при действии других концентраций кортексина не наблюдалось (рис. 3). Отчетливая стимуляция развития эксплантатов коры головного мозга выявлялась при действии пептида мозга в концентрации 20 нг/мл, когда ИП опытных эксплантатов на 40±7% ($n=19$, $p<0.05$) был выше ИП контрольных фрагментов коры ($n=15$). Эпителамин и пептид эпифиза во всем исследованном диапазоне концентраций от 2 до 400 нг/мл не вызывали стимуляции развития фрагментов ко-

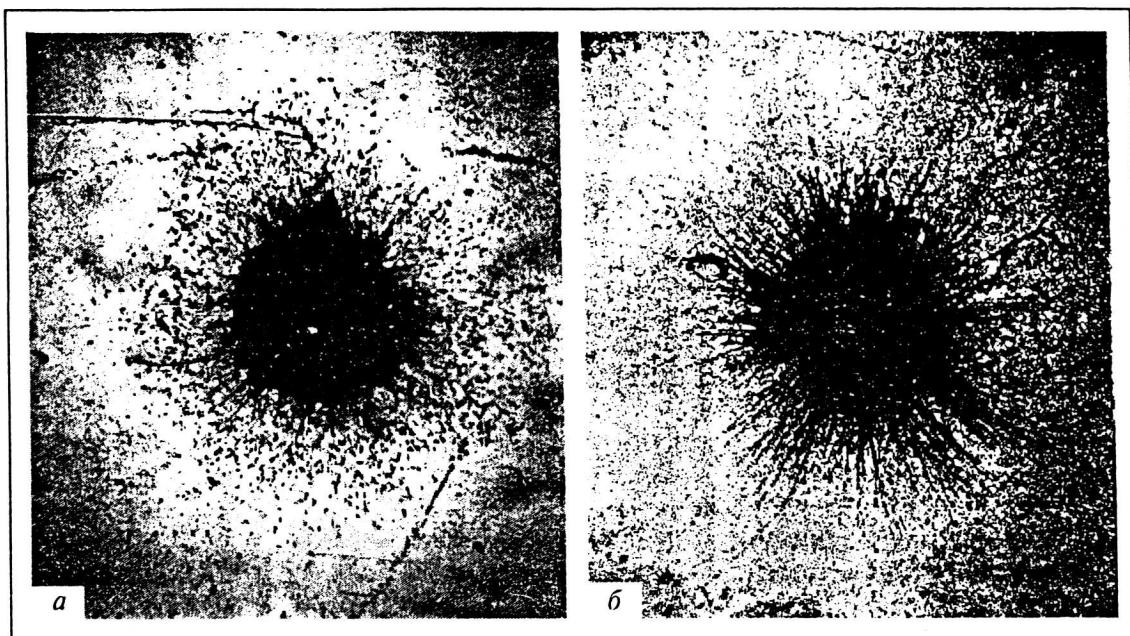


Рис. 1. Эксплантасты спинномозговых ганглиев на 3-и сутки культивирования.
а – контроль, б – в среде с добавлением 2 нг/мл пептида мозга. Окраска гематоксилином-эозином, ув. 35.

ры в культуре ткани, причем концентрация эпипиталамина 200 нг/мл давала даже некоторое (статистически недостоверное) угнетение роста эксплантата (рис. 3).

В другой серии опытов культивировались фрагменты подкорковых образований головного мозга эмбриона цыпленка. При добавлении к таким эксплантатам эпипиталамина в концентрации 200 нг/мл ИП эксплантатов увеличивался на $27 \pm 7\%$ ($n=22$, $p<0.05$) по сравнению с ИП

в контроле ($n=19$). Концентрация эпипиталамина 20 нг/мл оказывала некоторое (статистически недостоверное) стимулирующее влияние на развитие эксплантатов подкоркового вещества мозга. На $25 \pm 5\%$ ($n=18$, $p<0.05$) возрастал ИП эксплантатов при действии пептида эпифиза в концентрации 100 нг/мл по сравнению с контролем ($n=14$). При добавлении в культуральную среду подкорковых образований кортексина в различных концентрациях выявился его ингибирующий эффект в концентрации 100 нг/мл: ИП на $67 \pm 3\%$ ($n=12$, $p<0.05$) ниже контрольных значений ИП ($n=14$). В данной концентрации кортексин стимулировал развитие эксплантатов СМГ и коры и ингибировал развитие эксплантатов подкорковых образований. Пептид мозга во всех исследованных концентрациях не оказывал никакого воздействия на развитие фрагментов подкорковых образований в культуре ткани.

При исследовании эксплантатов СМГ, коры и подкорковых образований на более длительных сроках культивирования (7 дней) выявлена те же эффекты НСЭ в тех же диапазонах концентраций. Иногда наблюдалось статистически недостоверное уменьшение ИП эксплантатов, видимо, за счет ретракции нервных волокон при увеличении сроков культивирования.

Подробно исследовали возможный потенцирующий эффект препаратов. На эксплантаты СМГ воздействовали различными сочетаниями эффективных концентраций исследуемых препаратов. Так, кортексин в концентрации 10 нг/мл

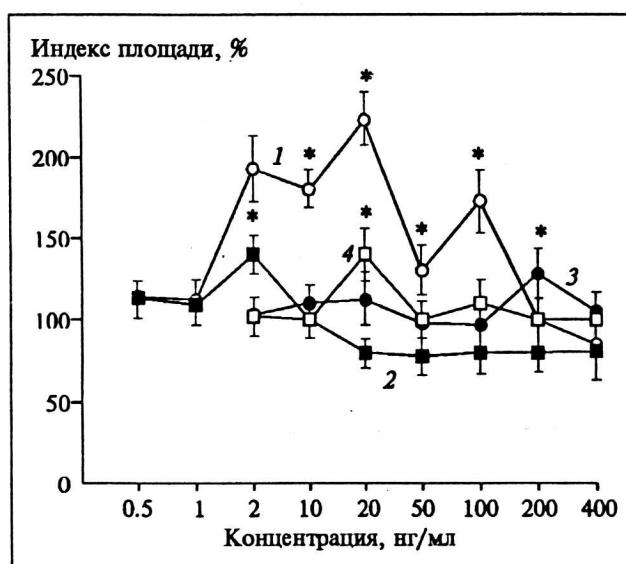


Рис. 2. Влияние кортексина (1), эпипиталамина (3), пептидов мозга (2) и эпифиза (4) на развитие спинномозговых ганглиев в культуре ткани.

Здесь и на рис. 3: * $p<0.05$ по сравнению с контролем.

и пептид мозга в концентрации 2 нг/мл давали при совместном введении в культуральную среду тот же эффект стимуляции роста нейритов, какой давал каждый из препаратов при раздельном применении. Не выявлялся потенцирующий эффект и при сочетанном применении эпипиталамина в концентрации 200 нг/мл и пептида эпифиза в концентрации 20 нг/мл. Оба искусственно сконструированных пептида — пептид мозга с эффективной концентрацией 2 нг/мл и пептид эпифиза с эффективной концентрацией 20 нг/мл — не вызвали увеличения ИП экспланштатов ганглиев при совместном применении по сравнению с ИП экспланштатов при раздельном применении каждого пептида.

В культуре фрагментов коры головного мозга эффективные концентрации кортексина (100 нг/мл) и пептида мозга (20 нг/мл) не оказывали потенцирующего эффекта.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в препаратах, полученных при экстрагировании из тканей головного мозга (кортексин) и из тканей эпифиза (эпипиталамин), содержатся фракции пептидов, положительно влияющих на развитие соответствующих корковых и подкорковых образований головного мозга. Наличие нескольких пиков НСЭ, что особенно выражено в случае кортексина, свидетельствует о наличии не одной, а нескольких активных фракций пептидов. Можно предположить, что в осуществлении стимулирующего эффекта кортексина и эпипиталамина играют роль и содержащиеся в них нейротрофические факторы, роль которых в поддержании функций нейронов показана [3,5]. Возможно, содержащиеся в кортексине и эпипиталамине нейротрофические факторы оказывали НСЭ в органотипической культуре СМГ цыпленка. Это подтверждает тот факт, что эти факторы не обладают видоспецифичностью [6] и поэтому препараты, полученные из мозга млекопитающих, оказывают стимулирующее влияние на СМГ и фрагменты головного мозга других видов животных.

В то же время искусственно сконструированные полипептиды обладали гораздо меньшим, по сравнению с экстрагированными препаратами, диапазоном эффективных концентраций: только одна концентрация для пептида мозга (2 нг/мл) и для пептида эпифиза (200 нг/мл). Однако эти концентрации оказывали отчетливый НСЭ в культуре СМГ, причем одинаковый по величине: при применении каждого пептида ИП экспланштатов увеличивался на 40% по сравнению с контролем.

В отношении тканей головного мозга наблюдалось уменьшение порога эффективных кон-

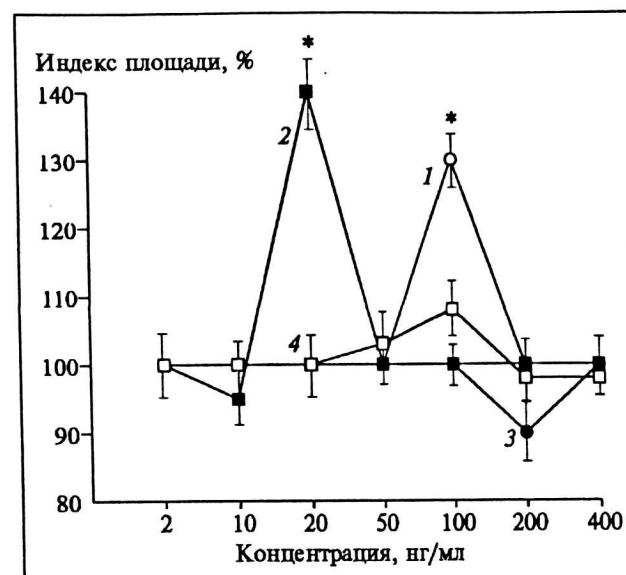


Рис. 3. Влияние кортексина (1), эпипиталамина (3), пептидов мозга (2) и эпифиза (4) на развитие фрагментов коры головного мозга в культуре ткани.

центраций для искусственно сконструированных полипептидов по сравнению с экстрагированными препаратами. Так, фрагменты культивируемой коры стимулировались при действии кортексина в концентрации 100 нг/мл, а при действии пептида мозга — в концентрации 20 нг/мл. Развитие экспланштатов подкорковых образований стимулировалось концентрациями 200 нг/мл эпипиталамина и 100 нг/мл пептида эпифиза. Все это может свидетельствовать о более выраженным и направленном действии на нервные клетки сконструированных пептидов. Отсутствие потенцирующего эффекта при совместном применении экстрагированных препаратов и искусственно сконструированных пептидов может свидетельствовать о том, что они действуют на одни и те же популяции нервных клеток, т.е. кортексин и пептид мозга действуют на одни и те же клетки коры головного мозга, а эпипиталамин и пептид эпифиза — на одни и те же клетки подкорковых структур.

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 гериатрической практике. В настоящее время для лечения таких тяжелых поражений нервной системы, как болезни Альцгеймера, Паркинсона, постинсультические состояния начинают использоваться рекомбинанты нейротрофических факторов [4,7]. Синтетические пептиды имеют несомненные пре-

имущества для применения в клинике, т.к. в связи с малой молекулярной массой не обладают иммуногенной активностью и не вызывают аллергических осложнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. // Успехи соврем. биол. - 1983. - Т. 96. - № 3. - С. 339-346.
2. Чалисова Н.И., Мелькишев В.Ф., Акоев Г.Н. и др. // Цитология. - 1991. - Т. 33. - № 2. - С. 29-31.
3. Ebendal T. // J. Neurosci. Res. - 1992. - Vol. 32. - N 3. - P. 461-470.
4. Levi-Montalcini R. // Annu. Rev. Neurosci. - 1982. - Vol. 5. - P. 341-362.
5. Sawada M., Itoh Y., Suzumura A. // Neurosci. Lett. - 1993. - Vol. 160. - N 2. - P. 131-134.
6. Scott B. // Progr. Neurobiol. - 1982. - Vol. 19. - N 1. - P. 187-194.
7. Spranger M., Lindholm D., Bandtlow C. // Eur. J. Neurosci. - 1990. - Vol. 2. - N 1. - P. 69-76.
8. Thoenen H., Korsching S., Barde Y-A. et al. // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. - 1989. - Vol. 48. - P. 679-684.

Поступила 19.02.97

НОВЫЕ КНИГИ

Г.Т.Сухих, Л.В.Ванько, В.И.Кулаков

ИММУНИТЕТ И ГЕНИТАЛЬНЫЙ ГЕРПЕС

В монографии рассматриваются роль иммунитета в репродукции,пренатальном онтогенезе иммунной системы, особенности состояния ее у беременной и новорожденного при физиологическом течении беременности и при генитальном герпесе у матери. Освещены проблемы диагностики, профилактики и лечения генитального герпеса, акушерской тактики при наличии его у беременных.

Книга рассчитана на врачей — акушеров-гинекологов, педиатров-неонатологов, иммунологов.

По всем вопросам относительно этого издания обращайтесь в редакцию журнала "Бюллетень экспериментальной биологии и медицины".