

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРЕ  
НЕРВНОЙ ТКАНИ

© Н. И. Чалисова, В. Х. Хавинсон

Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН,  
Россия, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6;  
Институт биорегуляции и геронтологии,  
Россия, 197042, Санкт-Петербург, ул. Вязовая, 12

Исследовали влияние кортексина, эпителиamina и синтетических полипептидов на рост отростков чувствительных нейронов и на развитие фрагментов коры и подкорковых образований головного мозга 10—11-суточных куриных эмбрионов в органотипической культуре. Кортексин в дозах 20 и 100 нг/мл, эпителиамин в дозах 20 и 200 нг/мл, полипептиды М и П в дозах 2 и 20 нг/мл оказывали нейрит-стимулирующее влияние, что обнаруживалось на 3-и сутки культивирования спинномозговых ганглиев. При добавлении кортексина в культуральную среду эксплантатов коры головного мозга в дозе 100 нг/мл или полипептида М в дозе 20 нг/мл обнаружена стимуляция развития эксплантатов. Та же доза кортексина в культуральной среде эксплантатов подкорковых образований подавляла их развитие. Эпителиамин в дозе 200 нг/мл или полипептид П в дозе 100 нг/мл стимулировали развитие эксплантатов подкорковых образований. Наличие нейрит-стимулирующего эффекта исследованных цитокинов позволяет выявлять механизмы действия пептидов головного мозга.

*Ключевые слова:* пептиды головного мозга, культура нервной ткани.

*N. I. Chalissova and V. Kh. Khavinson. STUDY OF CYTOKINS IN NEURAL TISSUE CULTURE.* I. P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Acad. Sci., 199034, St. Petersburg, Nab. Makarova, 6, and Institute of Bioregulation and Gerontology, 197042, St. Petersburg, 12, Vyazovaya St., Russia.

Natural brain peptides cortexin and epithalamine, and synthetic polypeptides were used to study their effects on organotypic culture of dorsal root ganglia and brain tissue from a 10—11-day old chick embryo. The effects involved activation of the tissue culture.

*Key words:* cortexin, epithalamine, synthetic polypeptides, tissue culture.

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

Цитомины — это пептидные биорегуляторы, поддерживающие структурный и функциональный гомеостаз клеточных популяций, которые содержат и продуцируют этот фактор. На основе цитоминов создан новый класс препаратов, содержащих комплекс полипептидных фракций, — кортексин и эпителиамин, выделенных соответственно из коры головного мозга и эпителиамуса крупного рогатого скота и включенных в Государственную фармакопею Российской Федерации [6,7].

Результаты экспериментальных и клинических исследований показывают, что комплексное применение пептидов коры головного мозга и эпифиза позволяет «замедлить ход биологических часов» в организме, уменьшить частоту возникновения опухолей и болезней, связанных со старением. Поэтому цитомины успешно ис-

пользуются в гериатрической практике [6]. Однако нейротрофические свойства их до сих пор не были исследованы.

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. В культуре нервной ткани по интенсивности роста нейритов можно четко проследить стимулирующее или ингибирующее действие того или иного ростового фактора. В модели органотипического культивирования нервной ткани (т. е. с сохранением структурной организации фрагмента ткани) возможно получение результатов, позволяющих раскрывать нейротрофические свойства цитокинов.

Классическим тест-объектом для биотестирования нейротрофической активности служит органотипическая культура спинномозговых ганглиев [9, 13, 16]. Чувствительные нейроны этих ганглиев отвечают усилением роста нейритов на введение в культуру наномолярных концентраций нейростовых факторов.

Целью работы было изучение развития эксплантатов периферической и центральной нервной системы в органотипической культуре ткани в присутствии эффективных концентраций кортексина, эпиталамина и их синтетических аналогов — полипептида М и полипептида П.

### МЕТОДИКА

Эксперименты проведены на 300 эксплантатах спинномозговых ганглиев и 250 фрагментах коры головного мозга и подкорковых образований 10—11-суточных эмбрионов цыпленка по методике, описанной ранее [9].

Питательная среда для культивирования эксплантатов состояла из 35 % раствора Игла, 25 % фетальной сыворотки телят, 35 % раствора Хенкса, 5 % куриного эмбрионального экзакта; в среду добавляли глюкозу (0,6 %), инсулин (0,5 ед/мл), пенициллин (100 ед/мл), глутамин (2 мМ). В эту среду помещали или спинномозговые ганглии куриных эмбрионов, или фрагменты коры головного мозга, или фрагменты подкорковых образований. Ганглии культивировали на подложке из коллагена во вращающихся пробирках в термостате при температуре 36,7 °C в течение 3 суток. Фрагменты центральной нервной системы культивировали в чашках Петри в термостате при температуре 36,7 °C в течение 2 суток. В экспериментальную среду добавляли кортексин, эпиталамин, полипептиды М и П (производство Института биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург) в концентрациях 2, 20, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 нг/мл. Критерием биологической активности служил индекс площади — соотношение площади всего эксплантата вместе с зоной роста к исходной площади ганглия или фрагмента мозга. Достоверность различий сравниваемых средних значений индекса площади оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения индекса площади выражали в процентах, контрольное значение индекса площади принималось за 100 %.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При развитии контрольных эксплантатов спинномозговых ганглиев, в культуральную среду которых не добавлялись кортексин и эпиталамин, происходило их расплывание на коллагеновой подложке, вокруг них выявлялись две зоны. Центральная зона состояла из немигрирующих дифференцирующихся нейробластов, а периферическая — из множества аксонов, растущих по окружности ганглия, а периферическая — из множества аксонов, растущих по окружности ганглия, а периферическая — из множества аксонов, растущих по окружности ганглия, а периферическая — из множества аксонов, растущих по окружности ганглия, а периферическая — из множества аксонов, растущих по окружности ганглия, а периферическая — из множества аксонов, растущих по окружности ганглия.

На 3-е сутки культивирования отчетливо наблюдался нейрит-стимулирующий эффект кортексина при двух концентрациях: при 20 нг/мл, когда индекс площади эксплантатов спинномозговых ганглиев был на  $123 \pm 7$  % ( $n = 8$ ,  $p < 0,05$ ) выше контрольного значения индекса площади ( $n = 10$ ), а также при концентрации 100 нг/мл, когда

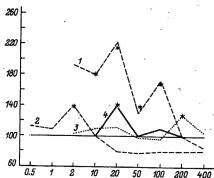


Рис. 1. Влияние кортексина (1), эпیتالаміна (2), поліпептида М (3) и поліпептида П (4) на развитие спинномозговых ганглиев в культуре ткани.

По оси абсцисс — концентрация препаратов, нг/мл; по оси ординат — индекс площади, %. Звездочки —  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

индекс площади эксплантата был на  $73 \pm 2\%$  ( $n = 12$ ,  $p < 0.05$ ) выше контрольного значения индекса площади (рис. 1). Уменьшение нейрит-стимулирующей 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. Имелось статистически достоверное уменьшение на  $85 \pm 5\%$  индекса площади при концентрации 50 нг/мл ( $n = 11$ ,  $p < 0.05$ ) по сравнению с индексом площади эксплантатов при концентрации 20 нг/мл ( $n = 8$ ) и статистически достоверное увеличение на  $35 \pm 3\%$  ( $n = 12$ ,  $p < 0.05$ ) индекса площади при концентрации 100 нг/мл по сравнению с индексом площади при концентрации 50 нг/мл ( $n = 11$ ).

При исследовании развития эксплантатов спинномозговых ганглиев в присутствии эпیتالаміна достоверный нейрит-стимулирующий эффект достигался также при двух концентрациях: при концентрации 20 нг/мл, когда индекс площади эксплантата был на  $12 \pm 2\%$  ( $n = 16$ ,  $p < 0.05$ ) выше контрольного значения индекса площади, и при концентрации 200 нг/мл, когда он был на  $28 \pm 8\%$  ( $n = 15$ ,  $p < 0.05$ ) выше контрольного значения ( $n = 12$ ) (рис. 1).

Такие два пика нейрит-стимулирующей активности у обоих препаратов могут быть связаны с наличием в каждом из них двух типов нейрит-стимулирующих полипептидов с различными эффективными концентрациями.

Отчетливо наблюдались дозозависимые эффекты при каждом пике эффективной концентрации. Концентрации кортексина 2 и 50 нг/мл давали меньший нейрит-стимулирующий эффект, чем концентрация 20 нг/мл, а концентрации 50 и 200 нг/мл давали меньшие значения индекса площади эксплантатов, чем 100 нг/мл.

Эпیتالамінін в концентрациях 2 и 50 нг/мл вызывал меньший по сравнению с концентрацией 20 нг/мл нейрит-стимулирующий эффект. Концентрации 100 и 400 нг/мл давали меньший стимулирующий эффект по сравнению с концентрацией эпیتالаміна 200 нг/мл (рис. 1).

При одновременном введении в культуральную среду эффективных концентраций кортексина и эпیتالаміна нейрит-стимулирующий эффект не возрастал по сравнению со стимулирующим эффектом каждого отдельного препарата. Таким образом, потенцирующее действие эффективных доз кортексина и эпیتالаміна в культуре спинномозговых ганглиев не наблюдалось (рис. 2).

Полипептиды М и П также обладали выраженным нейрит-стимулирующим действием. Эффективные концентрации их были 2 и 20 нг/мл, что приводило к увеличению индекса площади экспериментальных эксплантатов на  $40 \pm 9\%$  ( $n = 18$ ,

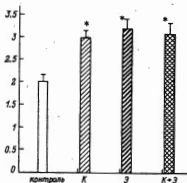


Рис. 2. Влияние 100 нг/мл кортиксина (К) и 200 нг/мл эпیتالаміна (Э) на развитие спинномозговых ганглиев в культуре ткани.

По вертикали — индекс площади (ИП), усл. ед. Звездочка —  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

$p < 0.01$ ) и  $40 \pm 5\%$  ( $n = 20$ ,  $p < 0.01$ ) соответственно по сравнению с индексом площади контрольных эксплантатов ( $n = 18$ ) (рис. 1). В отличие от кортиксина у каждого из синтетических полипептидов имелся только один статистически достоверный пик увеличения нейрит-стимулирующей активности. При остальных концентрациях, кроме эффективной, изменения нейрит-стимулирующей активности были статистически недостоверны и носили фоновый характер.

При исследовании непосредственного влияния кортиксина и эпیتالаміна на ткани центральной нервной системы были поставлены следующие серии опытов.

В питательную среду эксплантатов коры головного мозга эмбрионов цыплят добавлялся кортиксин в различных концентрациях. При концентрации 100 нг/мл, которая являлась эффективной при развитии эксплантатов спинномозговых ганглиев, наблюдалось достоверное повышение индекса площади эксплантатов на  $12 \pm 2\%$  ( $n = 14$ ,  $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольными значениями индекса площади ( $n = 9$ ). Достоверных различий индекса площади эксплантатов коры при действии других концентраций кортиксина не наблюдалось (рис. 3), в том числе и при кон-

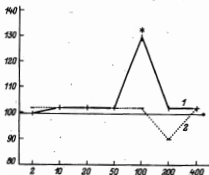


Рис. 3. Влияние кортиксина (1), эпیتالаміна (2) на развитие фрагментов коры головного мозга в культуре ткани.

По оси абсцисс — концентрация препаратов, нг/мл; по оси ординат — индекс площади, %. Звездочка —  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

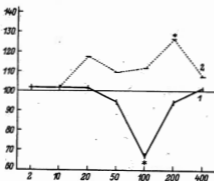


Рис. 4. Влияние кортексина (1), эпیتالамина (2) на развитие фрагментов подкорковых структур головного мозга в культуре ткани.

По оси абсцисс — концентрация препаратов, нг/мл; по оси ординат — индекс площади, %. Звездочки —  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

центрации 20 нг/мл, которая была эффективной для первого пика нейрит-стимулирующей активности в культуре спинномозговых ганглиев. Различные концентрации эпیتالамина, в том числе эффективные в отношении спинномозговых ганглиев, не вызвали достоверных различий в индексе площади эксплантатов коры головного мозга (рис. 3):

В серии опытов культивировались фрагменты подкорковых образований головного мозга эмбриона цыпленка. При добавлении к таким эксплантатам эпیتالамина в концентрации 200 нг/мл, которая являлась эффективной в отношении спинномозговых ганглиев, наблюдалось достоверное увеличение индекса площади на  $27 \pm 3\%$  ( $n = 15$ ,  $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольными индексами площади ( $n = 15$ ).

Другие концентрации эпیتالамина, в том числе и 20 нг/мл, не оказывали стимулирующего воздействия на развитие эксплантатов подкорковых образований (рис. 4). 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 100 нг/мл кортексина происходило уменьшение индекса площади эксплантатов на  $33 \pm 2\%$  ( $n = 11$ ,  $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольными значениями индекса площади ( $n = 9$ ) (рис. 4).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные свидетельствуют о том, что в кортексине имеется фракция пептидов, стимулирующих развитие коры головного мозга, а в эпیتالамине содержится фракция пептидов, положительно влияющих на развитие подкорковых образований головного мозга. Можно предположить, что в осуществлении этого стимулирующего эффекта комплексных препаратов играют роль, возможно, содержащиеся в них нейтрофические факторы.

В нейробиологии и медицине большое внимание уделяется в настоящее время нейротрофическим факторам (НТФ), которые впервые были обнаружены два десятилетия тому назад. Эти факторы 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 морфофункциональных свойств зрелых клеток [1, 2, 9, 10, 14, 16]. Наиболее

изученными и очищенными до гомогенного состояния являются нейротрофические факторы, принадлежащие к семейству нейротрофинов: фактор роста нервов, производимый из мозга нейротрофический фактор и нейротрофины-3, 4, 5. Часть нейротрофических факторов вырабатывается самими нервными клетками по аутокринному типу [2,4]. В центральной нервной системе они продуцируются пирамидными клетками и гранулярными нейронами гиппокампа и ретроградным путем поступают в область базального мозга. Кроме того, большое количество таких факторов вырабатывается глиальными клетками головного мозга — астроцитами [11], а также секретировается аденогипофизом [12].

Можно полагать, что при выделении кортексина и эпиталамина из коры и подкорковых структур головного мозга в них остаются содержащиеся в тканях центральной нервной системы нейротрофические факторы, которые и вносят свой вклад в нейрит-стимулирующий эффект в органоиницической культуре спинномозговых ганглиев цыпленка. Косвенным подтверждением этому может служить тот факт, что нейротрофические факторы не обладают 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 оказывал стимулирующий эффект на ткани головного мозга. Причем это были 200 нг/мл кортексина и 200 нг/мл эпиталамина, т. е. больше, чем значения первого пика эффективной в отношении спинномозговых ганглиев концентрации (20 нг/мл). Видимо, эффективная для тканей центральной нервной системы нейротрофическая активность имела в диапазоне 100—200 нг/мл, что соответствует данным об эффективной концентрации такого нейротрофического фактора, как фактор роста нервов [11,16]. Для дальнейшего детального выявления содержания нейротрофических факторов в кортексине и эпиталамине необходимо исследование с использованием антител к нейротрофическим факторам, содержащимся в тканях центральной нервной системы. Однако выявленная при биотестировании в культуре нервной ткани нейротрофическиподобная активность кортексина и эпиталамина, а также синтетических полипептидов позволяет рассматривать эти цитокины как биорегуляторы, необходимые для развития нервной ткани.

Обнаруженное в экспериментах в культуре нервной ткани отчетливое нейрит-стимулирующее действие кортексина и эпиталамина, а также полипептидов М и П открывает некоторые перспективы для практического применения данных пептидов при нейродегенеративных заболеваниях. Необходима корректная экстраполяция данных, полученных в культуре нервной ткани об эффективных нейрит-стимулирующих концентрациях цитокинов, на целостный организм животного и человека. Отработка дозировок необходима для исключения ингибирующего действия пептидов, как это происходит при повышении концентрации у многих цитокинов.

Таким образом, исследование в культуре нервной ткани различных пептидов головного мозга выявляет их свойства влиять на процессы регенерации и пластичности нервной ткани, что позволит в дальнейшем вести целенаправленный поиск эффективных цитокинов для коррекции нарушений в периферической и центральной нервной системе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Акоев Г. Н., Чалисова Н. И. Нейротрофические факторы из ЦНС. Успехи физиол. наук. 21 (4) : 138—142. 1990.
- [2] Горбунова Н. Б., Калюнов В. Н. Фактор роста нервов при различных видах стресса в эксперименте. Известия АН БССР. 3 : 85—89. 1993.
- [3] Гончарова В. П., Чалисова Н. И., Романюк А. В., Акоев Г. Н. Нейрит-стимулирующее действие в культуре ткани белка, выделенного из лизосомальной фракции ткани мозга. Докл. АН СССР. 285 (5) : 1238—1241. 1985.

- [4] *Кавинов В. Н.* Биология фактора роста нервной ткани. Минск. Наука и техника. 1986.
- [5] *Морозов В. Г., Хавинсон В. Х.* Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем — цитомедины. Успехи соврем. биологии. 96 (3) : 339—346. 1983.
- [6] *Хавинсон В. Х.* Итоги изучения и применения пептидных биорегуляторов в геронтологии. Тез. докл. Международного симпозиума «Геронтологические аспекты пептидной регуляции функции организма». СПб. Наука. 84—85. 1996.
- [7] *Хавинсон В. Х., Морозов В. Г., Кузник Б. И.* Цитомедины и их роль в регуляции физиологических функций. Успехи соврем. биологии. 115 (3) : 353—367. 1986.
- [8] *Чалисова Н. И., Мельшиев В. Ф., Ахоев Г. Н., Людино М. И., Куренкова Т. Ю.* Стимулирующее влияние пролактина на рост нейритов чувствительных нейронов в органотипической культуре. Цитология. 33 (2) : 29—31. 1991.
- [9] *Чалисова Н. И., Якух С. Л., Людино М. И.* Исследование нейрит-стимулирующей активности цереброспинальной жидкости у детей. Тез. докл. конф. «Детская неврологическая инвалидизация. Пути преодоления». Самара. 27. 1993.
- [10] *Barde Y. A., Edgar D., Thoenen H.* Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Bur. Mol. Biol.* 1 : 549—553. 1988.
- [11] *Ebendal T.* Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J. Neurosci. Res.* 32 (1) : 461—470. 1992.
- [12] *Glasky A. G., Ritzman R. F., Melchion C., Thomas J.* AIT-82 modulates neuritogenesis through a carbon monoxide/guanilate cyclase mechanism and restores age-induced memory deficits. *Soc. Neurosci. Abstr.* 20 (2) : 1099. 1994.
- [13] *Hamburger V., Hamilton H.* A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88 (1) : 49—92. 1951.
- [14] *Klein R., Martin-Zanca D., Barbacid H., Thoenen H.* Expression of the tyrosine kinase receptor gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development.* 109 (1) : 845—850. 1990.
- [15] *Korshing S., Auburger G., Heumann R.* Levels of nerve growth factor (NGF) and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *EMBO J.* 4 : 1389—1393. 1985.
- [16] *Levi-Montalcini R., Angeletty P.* Nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 48 : 543—569. 1968.

Поступила 31 V 1998  
После доработки 8 VI 1998