



УДК 57.053:576.535.5

СТИМУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ
ФИБРОБЛАСТОВ ФАКТОРОМ РОСТА НЕРВОВ ИЗ
СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ БЫКАМОВСЕЯН В. А., КОНДРАТЬЕВ А. Д., *МАГАКЯН Ю. А.,
*КОЛУХЧЕВА Н. А., **ГАСПАРЯН Г. Г., СЕВЕРИН Е. С.

Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва

*Институт экспериментальной биологии АН АрмССР,

**Институт зоологии АН АрмССР, Ереван

Фактор роста нервов (ФРН)—белок, играющий важную роль в процессах дифференцировки, поддержания жизнеспособности и ориентации симпатических и сенсорных нейронов [1].

В настоящее время всесторонне изучается действие ФРН на развитие и функционирование клеток нейронального происхождения как *in vivo*, так и *in vitro* на таких модельных системах, как первичные культуры ганглиев куриного эмбриона, клональная линия феохромоцитомы крысы РС-12 и др. [2—5]. В то же время практически не исследован вопрос о возможном влиянии фактора на клетки, составляющие окружение нервной ткани.

Целью данной работы было изучение влияния ФРН на пролиферативную активность клеток ненейронального происхождения. ФРН выделяли из семенной плазмы быка в гомогенном состоянии. Полученный фактор сходен с β -ФРН из подчелюстных желез мыши [6] и, как было показано нами ранее, обладает способностью вызывать рост нейритов у клеток феохромоцитомы РС-12 [7].

ФРН выделяли по методу Haeger и соавт. [6] в модификации Кондратьева и соавт. [8]. В качестве модели для исследования ненейрональных клеток *in vitro* использовали стационарную культуру фибробластов куриного эмбриона. Первичную культуру клеток получали по стандартной методике [9]. В эксперименте применяли вторичную культуру, растущую на покровных стеклах во флаконах, содержащих по 2 мл среды 199 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Плотность посева составляла $1-1,5 \cdot 10^5$ кл./мл. Стационарную культуру получали с помощью длительно (7 суток) содержания клеток без смены среды. Пролиферацию клеток стимулировали добавлением в среду ФРН в концентрациях от 1 нг/мл (0,034 нМ) до 1 мкг/мл (34 нМ), а также путем смены среды на свежую, содержащую 10% ЭТС с добавлением ФРН (0,9 нМ) и без него. Одновременно в среду вводили 3Н-тимидин в концентрациях

1 мкКи/мл для ранних (до 8 ч) и 0,1 мкКи/мл для более длительных сроков инкубации. На разных сроках покровные стекла с клетками промывали 0,9%-ным раствором NaCl, pH 7,2 и фиксировали в смеси этанол—ледяная уксусная кислота (3:1) 15 мин с последующей промывкой в этаноле 10 мин. Для радиоавтографии препараты покрывали жидкой эмульсией марки «М» (НИИХимфотопроект, Москва), после 7-суточной экспозиции проявляли, фиксировали, промывали в проточной воде и окрашивали красителем Гимза. Количество клеток, включивших ^3H -тимидин, подсчитывали с помощью светового микроскопа при увеличении $\times 1300$ (для каждого случая—2—3 тысячи клеток). Статистическую обработку проводили по общепринятой методике.

Протеазную активность препарата ФРН определяли по методу Kunitz [10], урокиназную активность—по методу Husain и соавт. [11]. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-Na проводили по методу Laemmli [12] с применением серебряного окрашивания [13].

Из данных, полученных в ходе эксперимента (рис. 1, а), следует, что после четкого выраженного лаг-периода длительностью 16—20 ч с момента введения ФРН (28 нг/мл) происходит стимуляция пролиферации клеток стационарной культуры фибробластов куриного эмбриона.

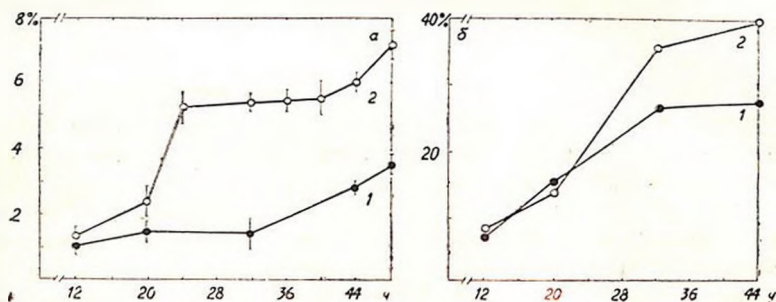


Рис. 1. Изменение индекса меченых клеток в стационарной культуре фибробластов куриного эмбриона на разных сроках инкубации. а—контроль (1), ФРН (2); б—смена среды на свежую (1), смена среды + ФРН (2). По оси абсцисс—время инкубации (ч), по оси ординат—индекс меченых клеток (%)

на. Максимум стимуляции приходится на период с 24 по 32 ч инкубации в присутствии ФРН, когда наблюдается более чем 3-кратное ($p < 0.01$), по сравнению с контролем, увеличение числа клеток, вступивших в S-период клеточного цикла. Из экспериментальной кривой видно, что после 32 ч инкубации клеток с фактором соотношение индекса меченых клеток к контрольному уровню более не возрастает. Это свидетельствует о том, что новые группы клеток, по-видимому, не вовлекаются в пролиферативный процесс.

Смена среды на свежую значительно повышала включение ^3H -тимидина в клетки. В то же время добавление ФРН (28 нг/мл) в сочетании со сменой среды (рис. 1, б) приводило к еще большему увеличению числа меченых клеток (35,7% на 32-ом часу инкубации), по сравнению со стимуляцией только сменой среды (26,8%, $p < 0.01$). Судя по полученным результатам, действие ФРН и свежей среды по-

сит, по-видимому, аддитивный характер, поскольку при совместном действии двух факторов общее число меченых клеток близко к сумме их прироста под влиянием каждого из стимулов в отдельности. Возможно, в основе описанной аддитивности лежит реакция разных фракций клеточной популяции на различные пролиферативные стимулы.

При обработке культур в течение 28 ч ФРН в концентрациях от 1 нг/мл до 1 мкг/мл обнаруживалось зависящее от дозы фактора увеличение числа меченых клеток (рис. 2). Достоверные отличия от уровня меченых клеток в контрольных культурах, составляющего в данном

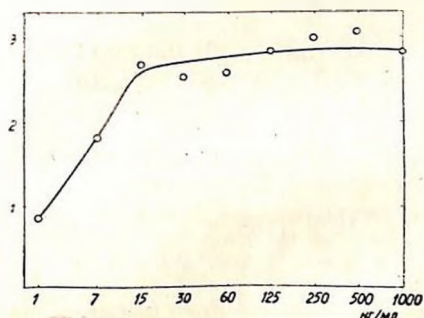


Рис. 2. Зависимость числа меченых клеток от концентрации ФРН в культуре фибробластов куринного эмбриона (28 ч инкубации). По оси абсцисс—концентрация ФРН в среде, по оси ординат—отношение числа включившихся 3Н-тимидин клеток к контрольному уровню (принят за 1)

опыте $9,92 \pm 1,84\%$, наблюдались в вариантах с ФРН, начиная с концентрации фактора в среде 7 нг/мл ($p < 0,01$). Кривая концентрационной зависимости достигала плато при концентрациях фактора 15 нг/мл и выше. Следует отметить, что аналогичные дозы ФРН вызывают стимуляцию роста нейритов у клеток РС-12 [7].

В ряде работ [14—16] был показан митогенный эффект некоторых протеаз, обладающих эстерапептидазной активностью при добавлении их в культуральную среду в концентрациях от 0,1 мкг/мл до нескольких мкг/мл. В связи с этим провели тестирование используемого в эксперименте препарата ФРН в концентрациях от 20 нг/мл до 1 мкг/мл на наличие указанной активности. Протеазная активность препарата составляла менее 0,03% от активности трипсина, используемого в качестве контроля. Урокиназная активность, свойственная γ -субъединице ФРН (см. ниже), не была обнаружена. Высокая степень чистоты препарата по данным гель-электрофореза в ПААГ и практически полное отсутствие протеазной активности указывают на то, что эффект стимуляции пролиферации связан с действием именно ФРН из семенной плазмы быка. Для ФРН из подчелюстных желез мыши, где фактор находится в виде белкового комплекса, состоящего из трех типов субъединиц [1], подобный эффект был показан лишь для γ -субъединицы, проявляющей свойства эстерапептидазы и урокиназы [14, 17] и не обладающей нейритстимулирующей активностью, характерной только для β -субъединицы [1—4]. Указанные выше отличия в действии ФРН из семенной плазмы и подчелюстных желез мы-

ши, возможно, связаны со структурными [6], а может быть, и функциональными различиями факторов из разных источников.

Изложенные результаты свидетельствуют о способности фактора роста нервов из семенной плазмы быка служить пролиферативным стимулом для клеток стационарной культуры фибробластов курного эмбриона. Можно предположить, что ФРН является фактором, обладающим многообразными регуляторными функциями. Возможно, что *in vivo* на ранних стадиях эмбриогенеза он обеспечивает, с одной стороны, дифференцировку нервных клеток, а с другой—рост клеток окружения нейрона.

STIMULATION OF CULTURED FIBROBLASTS PROLIFERATION BY NERVE GROWTH FACTOR FROM BOVINE SEMINAL PLASMA

MOVSESYAN V. A., KONDRATYEV A. D., *MAGAKYAN U. A.,
*KOLTIKHICHEVA N. A., **GASPARYAN G. G., SEVERIN E. S.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;

*Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Arm. SSR,

**Institute of Zoology, Academy of Sciences of the Arm. SSR, Yerevan

The influence of nerve growth factor (NGF) from bovine seminal plasma on proliferative activity of cells of non-neuronal origin was studied. Growth-stimulating ability of bovine NGF was demonstrated on the confluent stationary culture of chick embryo fibroblasts. About 3-fold increase in the number of ³H-thymidine labelled cells was shown when the culture was incubated with the factor. The possible role of NGF in the regulation of proliferation and differentiation of cells of different origin is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Thoenen H., Earle Y. A. *Physiol. Rev.*, v. 60, p. 1284—1335, 1980.
2. Yanker B. A., Shooter E. M. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 51, p. 845—868, 1982.
3. Calissano P., Cattaneo A., Biocca S., Aloe L., Mercanti D., Levi-Montalcini R. *Exp. Cell. Res.*, v. 154, p. 1—9, 1984.
4. Green L., Tishler A. *Adv. in cell. Neurobiol.*, v. 3, p. 373—414. Acad. Press, New York, 1982.
5. Калюнов В. Н. Фактор роста нервной ткани. Минск. Наука и техника, 1984.
6. Harper G. P., Glanville R. W., Thoenen H. J. *Biol. Chem.*, v. 257, p. 8541—8548, 1982.
7. Мовсесян В. А., Кондратьев А. Д., Дудкин С. М. Материалы VIII объединенного симпозиума биохимических обществ СССР и ГДР, Рига, 1985.
8. Кондратьев А. Д., Мовсесян В. А., Курочкин С. Н., Дудкин С. М., Северин Е. С. Биотехнология, т. 1, № 2, с. 91—97, 1985.
9. Rein A., Rubin H. *Exp. Cell. Res.*, v. 49, p. 666, 1968.
10. Kunitz M. J. *Gen. Physiol.*, v. 30, p. 291—296, 1947.
11. Husain S. S., Lipinski B., Gurewicz V. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 78, p. 4265—4269, 1981.

12. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—851, 1970.
13. Wray W., Bouliskas T., Wray V., Nancock R. Anal. Biochem., v. 113, p. 197—203, 1981.
14. Green L. A., Tomita J. T., Varon S. Exp. Cell. Res., v. 64, p. 387—395, 1971.
15. Burger M. M. Nature, v. 227, p. 170—172, 1970.
16. Teng N. H., Chen L. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 72, p. 413—417, 1975.
17. Orenstein N. S., Dvorak H. F., Blanchard M. H., Ioung M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 75; p. 5497—5500, 1978.

Поступила 25. VII 1985