



УДК 612.82+577.112+577.113

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ МОЗГА НА ВКЛЮЧЕНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В ДНК И БЕЛОК КУЛЬТИВИРУЕМОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ

ВИТВИЦКИЙ В. Н., ВИКТОРОВ И. В., ШАШКОВА Н. А.

Институт общей генетики АН СССР, *НИИ мозга ВЦ
психического здоровья АМН СССР, Москва

В настоящее время можно считать твердо установленным фактом, что регуляция пролиферативных процессов в клетках животных происходит путем сложного взаимодействия систем активации и ингибирования деления клеток [1, 2]. В ряде работ описана большая группа активаторов и ингибиторов пролиферации, так называемых положительных и отрицательных ростовых факторов [3—5]. Например, стимулирование роста и деление клеток можно вызвать различными ионами, глюкозой и другими сахарами, некоторыми липидами, биогенными аминами, простагландинами, некоторыми гормонами и большой группой пептидных ростовых факторов, полученных из самых разных тканей и клеток (фибробластов, тромбоцитов, хряща, мышц, эпителия, мезодермы, эндокринных клеток, нейронов и глиальных клеток) [4, 5]. Все эти вещества имеют слабую тканевую специфичность и не обладают видовой специфичностью. Например, фактор роста нервной ткани [6—8], стимулирующий развитие симпатических нейронов и впервые обнаруженный в опухолевых клетках, синтезируется в наибольших количествах в слюнной, подчелюстной и предстательной железах животных и содержится лишь в очень небольших количествах в головном мозгу. Остается открытым вопрос о специфических тканевых регуляторах роста и пролиферации клеток нервной ткани, который в настоящее время приобретает все большее значение в связи с интенсивным развитием молекулярных и молекулярно-генетических исследований патологических процессов НС и разработкой проблемы трансплантации и регенерации ткани и клеток мозга.

В связи с тем, что биохимически идентифицированные факторы роста и пролиферации клеток мозга изучены наиболее слабо, нами была предпринята попытка выделения и индивидуального исследования от-

дельных веществ—регуляторов пролиферации. при этом мы исходили из известных фактов, что экстракты, выделенные из разных отделов мозга на стадиях активной клеточной пролиферации, способны стимулировать деление клеток этой же ткани в условиях клеточных или тканевых культур [9, 10]. С другой стороны, экстракты из тех структур мозга, для которых на данном этапе развития клеточная пролиферация не характерна, могут ингибировать пролиферацию [11, 12].

В наших предыдущих исследованиях [13—15] разработана процедура фракционирования экстрактов мозга, получены в чистом виде и частично охарактеризованы три группы активаторов и ингибиторов пролиферации клеток мозга.

Настоящая работа посвящена сравнительному изучению влияния выделенных нами активаторов пролиферации низкомолекулярного кислого пептида $pI=3.6$ и нейтрального белка $pI=6.8$ [15] на клетки мозга в реагрегированных культурах.

Фракционирование экстрактов коры мозга 15—17-дневных эмбрионов крыс или мозжечка 8—10-дневных крыс, то есть участок мозга, для которых на данной стадии развития характерны активные пролиферативные процессы, и получение кислого пептида $pI\ 3.6$ и нейтрального белка $pI\ 6.8$ включало процедуры ультрацентрифугирования, высаливания при возрастающих концентрациях сульфата аммония, гель-фильтрации и ИЭФ [13—15].

Первый этап очистки экстрактов представлял собой осаждение фракций, активирующих пролиферацию, с использованием возрастающих концентраций сульфата аммония (основная масса этих белков осаждается при концентрации соли от 60 до 100% насыщения). Затем белки, стимулирующие включение [3H]тимидина в ДНК клеток нервной ткани, очищали от солей на колонке с сефадексом G-25 и подвергали ИЭФ на колонке по модифицированному методу Weller и соавт. [16]. Отдельные фракции, снятые с колонки, подвергали диализу для очистки от амфилинов и сахарозы и добавляли к определенному количеству клеток нервной ткани, находящихся в среде Эрла, содержащей [3H]тимидин.

Глио-нейрональные агрегаты получали при культивировании в суспензии диссоциированных клеток головного мозга 16—19-дневных эмбрионов мышей линии C57B1 [17]. Питательная среда для культивирования состояла из 30% смеси равных объемов плацентарной человеческой и эмбриональной телячьей сыворотки, 50% минимальной среды Игла, 20% сбалансированного солевого раствора Симмса и содержала 600 мг% глюкозы, 0,2 ед/мл инсулина, 2 мМ глутамина. В экспериментальных сериях культур в среду вводили кислый ($pI\ 3.6$) или нейтральный ($pI\ 6.8$) пептиды в концентрациях 10, 30, 40 мкг/мл. Питательная среда в контрольных сериях содержала сывороточный альбумин в тех же концентрациях. Для определения скорости биосинтеза белка и ДНК в питательную среду добавляли [^{14}C]меченный гидролизат белка (10 мкг/мл с У.А. 40 Кп/мМ) и [3H]тимидин (50 мкг/мл с У.А.

59 Кн/мм). Взвесы клеток в среде, содержащей все вышеуказанные компоненты (по 3 мл), помещали во флаконы из-под антибиотиков и культивировали в портативной роллерной установке по методике, разработанной в нашей лаборатории [17]. Через 24, 48, 72, 96 ч культуры отбирали для дальнейших исследований и при необходимости сохраняли до обработки при $-16-20^{\circ}$.

Для определения включения метки в белки и нуклеиновые кислоты глио-нейрональные агрегаты отделяли от среды центрифугированием (800 об/мин. 5 мин), отмывали от невключившихся меченых предшественников в физиологическом растворе с последующим осаждением центрифугированием (3 раза) и лизировали в 1%-ном растворе ДДС-Na с последующим прогреванием (100° , 5 мин). В полученных лизатах спектрофотометрически определяли концентрацию белка и ДНК, растворяли их в определенном объеме тритон-толуольного сцинтиллятора для гомогенного счета и просчитывали на ^{14}C и на ^3H в счетчике «Intertecinique SL-4000» (Франция).

Как показали проведенные нами исследования [13—15], фракционирование экстрактов из участков мозга, в которых на данной стадии развития организма идет активная пролиферация клеток, дает возможность получить различные группы веществ, способных стимулировать пролиферацию клеток переживающих срезов мозга крыс и включение ^3H тимидина в репликативном синтезе ДНК. Первая группа была идентифицирована нами [14] как кислый низкомолекулярный пептид (рI 3.6), способный заметно усиливать синтез ДНК при добавлении его в систему *in vitro* в концентрации 1 мкг/мл. Вторая группа идентифицирована как нейтральный (рI 6.8) белок [15].

Выделенные нами пептидные факторы тестировали в культурах ре-агрегированных клеток эмбрионального мозга мышей. Проведенные исследования показали, что в процессе развития глио-нейрональных агрегатов в течение первых 4-х суток (96 ч) происходит интенсивное включение ^3H тимидина в ДНК и ^{14}C аминокислот в белки культивируемых клеток. В дальнейшем скорость включения метки постепенно снижалась, что, по-видимому, связано с процессами дегенерации части культивируемых клеток в результате истощения питательной среды. Добавление в среду инертного белка—сывoroточного альбумина (СА) в концентрации до 100 мкг/мл не меняло общей картины включения меченых предшественников (кривые со знаком «+» на рис. 1, 2).

Далее нами были проведены опыты по исследованию включения меченых предшественников в ДНК и белки культивируемых клеток мозга в присутствии описанных ранее пептидного и белкового активаторов пролиферации.

Типичная кривая, полученная в одном из таких опытов, приведена на рис. 1. В качестве контроля использовали обычную суспензионную культуру глио-нейрональных агрегатов, в питательную среду которой добавляли СА в концентрации 100 мкг/мл. В питательную среду экспериментальных культур добавляли эквивалентное количество рI 3,6 пеп-

тида—активатора пролиферации. Как следует из результатов, приведенных на рис. 1, наличие в культуральной среде пептида рІ 3,6 значительно увеличивало включение $[^3\text{H}]$ тимидина в культивируемые клетки (рис. 1, а), однако присутствие этого фактора не сказывалось на скорости включения $[^{14}\text{C}]$ аминокислот в белки исследованных клеток (рис. 1, б).

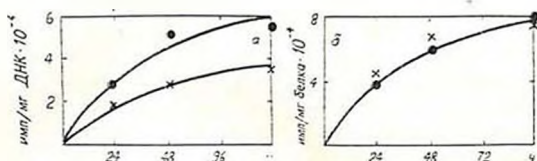


Рис. 1. Включение $[^3\text{H}]$ тимидина/мг ДНК (а) и $[^{14}\text{C}]$ меченых аминокислот/мг белка (б) культивируемых клеток при добавлении в среду рІ 3,6 пептида в концентрации 100 мкг/мл (●), или эквивалентного количества бычьего сывороточного альбумина (X)

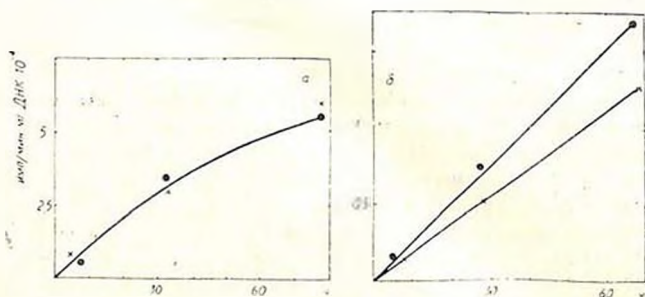


Рис. 2. Включение $[^3\text{H}]$ тимидина/мг ДНК культивируемых клеток (а), и включение $[^{14}\text{C}]$ меченых аминокислот/мг белка (б) при добавлении в среду рІ 6,8 белка в концентрации 100 мкг/мл (●), или соответствующего количества бычьего сывороточного альбумина (X)

Совершенно иначе ведет себя исследованный нами белковый фактор рІ 6,8 при добавлении его в той же концентрации в среду для культивирования глио-нейрональных агрегатов. Как видно из рис. 2, белок рІ 6,8 практически не влияет на включение $[^3\text{H}]$ тимидина в ДНК, но заметно повышает включение $[^{14}\text{C}]$ аминокислот в белки культивируемых клеток мозга.

Вряд ли можно сомневаться в наличии в развивающейся нервной ткани отдельных клеточных популяций, для которых характерно преобладание синтетических процессов на уровне ДНК или белка. Известно, что на разных стадиях клеточного цикла в развивающихся клетках последовательно включаются отдельные этапы процессов внутриклеточного синтеза. Например, S-фаза характеризуется главным образом уси-

лением синтеза ДНК и, по данным некоторых авторов, синтез белка на этой фазе значительно замедляется, тогда как на стадиях, связанных с «клеточным покоем», согласно литературным данным, значительно возрастает синтез белка [18]. С другой стороны, в несинхронизированных культивируемых клетках, с которыми мы имели дело в наших опытах, усиление одного из синтетических процессов, по-видимому, не может не сказываться на скорости вступления клетки в следующую фазу митотического цикла и должно привести к интенсификации других процессов синтеза. Остается неясным, почему в данном исследовании нам не удалось обнаружить прямой связи усиления синтеза ДНК с соответствующим повышением синтеза белковых компонентов клеток. Возможно, наличие избытка стимуляторов определенного синтеза при относительно коротком времени эксперимента обуславливает резкое преобладание одного из синтетических процессов над другими. Однако для более точного ответа на этот вопрос необходимы дополнительные исследования.

Использованные в настоящей работе методы биохимического анализа процессов синтеза ДНК и белка не позволяют с достаточной достоверностью ответить на вопрос о том, какие клетки, входящие в состав развивающихся глио-нейрональных агрегатов, служат мишенями изучаемых факторов. Предварительные данные, полученные методом компьютерной морфометрии на полутонких срезах глио-нейрональных агрегатов с использованием анализатора изображений типа ТАС [19], показали, что в присутствии фактора рI 3,6 увеличивается количество клеток, характеристики которых позволяют отнести их к нейроглиальным. В то же время, влияние фактора рI 6,8 сопровождается ускоренным по сравнению с контролем увеличением размеров тел клеток, составляющих глио-нейрональные агрегаты. В дальнейшем предполагается более детально изучить действие описанных факторов на разные типы глиальных клеток и нейроны, используя гистоавтордиографические методы, а также тестировать действие этих факторов в системе *in vivo* при введении их в ликвор желудочков мозга млекопитающих.

EFFECT OF PEPTIDE FACTORS FROM BRAIN ON THE INCLUSION OF PRECURSORS INTO DNA AND PROTEIN IN NERVOUS TISSUE CULTURE

*VITVITSKY V. N., VICTOROV I. V., SHASHKOVA N. A.

Institute of General Genetics Acad. Sci. USSR, Moscow. *Brain Research
Institute of the All-Union Center of Mental Health Acad. Med.]
Sci. USSR, Moscow

The acid (pI 3,6) low molecular weight peptide and neutral (pI 6,8) protein were obtained from the developing cerebellum of the rat's brain. The data obtained show that the peptide enhances significantly the incorporation of ^3H -thymidin into DNA of cultured cells of

the embryonic brain and doesn't influence the protein synthesis. The protein increases the rate of ^{14}C -amino acids incorporation into newly synthesized proteins and doesn't influence the synthesis of DNA of the cultured brain cells. The data obtained in the morphological studies on reaggregated cultures of the embryonic brain cells suggests that the acid peptide (pl 3,6) increases the mitotic activity of glial cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bullough W. S. Biol. Rev., v. 50, p. 99—127, 1975.
2. Bullough W. S.—In: Growth Kinetics and Biochemical Regulation of Normal and Malignant Cells (eds B. Brewinco, R. M. Hamphry), p. 77—89, Baltimore; Williams and Wilkins Co., 1975.
3. Rudland P. S., de Asua L. J. BBA, v. 560, № 1, p. 91—133, 1979.
4. Tissue Growth Factors (ed. R. Baserga), Springer-Verlag, 1981.
5. Holley R. W.—In: Funct. Regulat. Cell and Mol. Levels, Proc. Symp. Physiol., p. 41—45, New-York, 1982.
6. Molecular Genetic Neuroscience (eds. F. O. Schmitt, S. J. Bird, F. F. Bloom.), New-York, Raven Press, 1982.
7. Родионова В. М., Родионов И. М., Ярыгин Б. Н. Успехи соврем. биол., т. 76, вып. 2, № 5, с. 310—327, 1973.
8. Каюнов В. Н. Фактор роста нервной ткани, Минск, Наука и техника, 1984.
9. Barakat I., Sensenbrenner M. Developmental Brain Res., v. 1, p. 355, 1981.
10. De Vries G. R., Salaer J. L., Bunde R. P. Developmental Brain Res., v. 3, p. 295, 1982.
11. Kolar S., Fodvarka P., Zvakova E. Experientia, v. 39, № 2, p. 168, 1983.
12. Torok L. J., Toro J. Embriologia, v. 6, p. 319, 1962.
13. Витецкий В. Н.—В сб.: Возбудимые клетки в культуре ткани. Материалы I Всесоюз. симпозиума, с. 145, Пушкино, 1984.
14. Витецкий В. Н. Биохимия, т. 50, № 10, с. 1616—1620, 1985.
15. Витецкий В. Н. Биологические науки, № 2, с. 102—106, 1986.
16. Weller D. L., Heaney A., Sjogren R. E. Biochim. et biophys. acta, v. 168, p. 576—581, 1968.
17. Викторова И. В., Лыжин А. А., Шашкова Н. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 99, № 5, с. 632—634, 1985.
18. Епифанова Е. О., Терских В. В., Полуновский В. А. Покоящиеся клетки. Свойства и функции в организме, М., Наука, 1983.
19. Hartman J., Faltin J., Lodin Z., Victorov I. V., Lisa V.—In: Proc. Symp. Neuro Ontogeneticum, Quartum, p. 36, Prague, 1985.

Поступила 28. IV 1986