

БИОТЕХНОЛОГИЯ КЛЕТОК НЕРВНОЙ ТКАНИ: ПРОБЛЕМА БЕЛКОВЫХ ТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

**В.Н.Никандров, Р.И.Гронская, О.Н.Жук, И.Б.Лукашевич, Е.Ф.Полукошко,
Г.П.Петрусенко, Н.С.Пыжова**

Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь, biblio@fizio.bas-net.by

Одна из глобальных задач современной биологии, биотехнологии и инженерии клетки – наработка значительной массы (масштабирование) жизнеспособных клеток различных тканей человека и животных, в т. ч. таких высокодифференцированных тканей как нервная и ткань миокарда для получения целевых продуктов биосинтеза, специфических для данных клеток, производства вирусных вакцин и т.д., а также для целей трансплантации.

Применительно к данным высокодифференцированным тканям особенно важным является обеспечение масштабной технологии факторами трофической поддержки, без которых невозможно достичь получения высокопродуктивных жизнеспособных культур и устранения действия повреждающих факторов.

Для роста и дифференциации клеток нервной ткани особое значение имеет ряд белковых факторов, включающих фактор роста эпидермиса - EGF (6 кДа), фактор роста нервов - NGF, продуцируемый головным мозгом фактор -BDNF, CNTF, продуцируемый глией фактор - GDNF, нейротрофины: NT-3, NT-4 (13,6-28,0 кДа). Однако эти белки чрезвычайно дороги. Это создает ряд трудно разрешимых проблем. В данной ситуации целесообразны два подхода:

- изыскание новых регуляторного типа белков, обладающих трофическим действием на клетки нервной ткани;
- углубленное изучение структурно-функциональной специфики перечисленных выше белков с целью создания в перспективе (полу)синтетических миметиков этих трoфинов.

Опираясь на изложенное в наших работах (1984-2004) представления о механизмах регуляции протеолиза (в частности, конценцию кислородзависимого пути активации плазминогена), с 1999 года нами развернут комплекс исследований роли компонентов перичеллюлярного протеолиза в жизнедеятельности клеток нервной ткани на органных и диссоциированных культурах симпатических (краниально-шейного, шейно-грудного), чувствительных (спинальных) ганглиев, неокортекса и мозжечка, а также на перевиваемых линиях глиомы С6 и феохромоцитомы РС12.

Изучение пролиферации, выживаемости клеток в этих культурах, их структуры по данным электронной микроскопии и отдельных метаболических особенностей (уровня АТФ-активируемого внутриклеточного протеолиза, I- и II-кальпаиновой активности) позволило получить совокупность оригинальных пионерских данных о протекторных свойствах белка GP в концентрации 10^{-10} - 10^{-7} М на клетки симпатических ганглиев, неокортекса, мозжечка, перевиваемых культур при повреждающем действии H_2O_2 (0,0001 М), глутамата (0,0001 М), АТФ (0,001 М) в анионной форме, NH_4Cl (0,01 М), охлаждения. Например, добавки GP способны предотвращать развитие некротических изменений при воздействии глутамата. На клетках РС12 продемонстрировано, что даже кратковременная экспозиция (20 мин) с белками GP и SZ в конечной концентрации порядка 10^{-9} М ведет к резким изменениям АТФ-активируемого и Ca^{2+} -активируемого внутриклеточного протеолиза.

Проведенные исследования позволили предложить приемы культивирования клеток нервной ткани (на дефицитной по белкам сыворотке крови питательной среде:

0,5% сыворотки крови вместо 15-25%), обеспечивающие ускорение созревания, улучшение адгезии, высокую выживаемость, увеличение количества и длины отростков, их арборизации. В частности, такой результат получен на культурах ткани неокортекса и мозжечка. Выявлены особенности ультраструктурных перестроек клеток нервной ткани (нейронов, астроцитов, олигодендроцитов), отражающее протекторное действие белков GP и SZ. В присутствии фактора GP общее число клеток глиомы C: возросло в несколько раз, а белок SZ позволял вести культуру феохромоцитомы PC12 на дефицитной по белкам сыворотки крови среде практически без потери числа клеток и выживаемости их не менее 95% в сравнении с контролем. В целом, предложенные решения позволяют отказаться от использования насыщенных белками сыворотки крови сред при наращивании клеток или ограничить использование подобных сред. Более того, подобный подход существенно облегчает выделение целевых белков метаболитов из культуральной жидкости (кондиционированной питательной среды).

Вместе с тем, белки GP или SZ не вызвали трансформацию энтерохромаффинных клеток линии PC12 по нейрональному пути как это свойственно NGF, хотя GP облегчал такую трансформацию.

На культурах клеток миокарда новорожденных крыс продемонстрировано длительное стимулирующее действие SZ на сократительную способность кардиомиоцитов при однократной добавке в питательную среду этого белка.

Исследования функциональных свойств олигомера NGF и трех его субъединиц позволили установить ранее неизвестные свойства: участие в протеолитических процессах (плазминоген-активаторную и прямую протеолитическую активность), генерировании и трансформации активных форм кислорода, прежде всего, супероксидного радикала, эндонуклеазную (ДНК-азную и РНК-азную) активность. Эти факты позволяют не только переосмыслить механизмы биологического действия NGF. Они создают предпосылки для проработки подходов к созданию биоимитаторов лигандов специфических для нейротрофинов рецепторов. Из сопоставления этих данных с результатами, полученными при изучении функциональных свойств других белков регуляторного характера нами развиты представления о важности собственной энзиматической активности этих белков для «возбуждения» соответствующего белка рецептора.

Чрезвычайно большой полиморфизм клеток нервной ткани в морфологическом, функциональном и метаболическом отношении, высокая степень дифференциации ряда клеточных элементов ткани, прежде всего нейронов обуславливают широкий масштаб фундаментальных и прикладных исследований в двух указанных выше по тексту направлениях, которые разрабатываются нашим институтом в содружестве с другими научными учреждениями.