

## ПОИСК НОВЫХ ТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ КЛЕТОК НЕРВНОЙ ТКАНИ

**В.Н. НИКАНДРОВ<sup>1</sup>, О.Н. ЖУК<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт физиологии НАН Беларуси  
г. Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Полесский государственный университет  
г. Пинск, Беларусь*

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

Культуры клеток последние десятилетия используются в биотехнологии для получения вирусных вакцин (противокоревой, полиомиелитной и т.д.), антител, интерферонов (фибробластного и лимфобластного), энзимов, гормонов, факторов роста (NGF, EGF, TGF и др.) [6,22]. Одной из примечательных разработок своего времени была экспериментальная технология получения тканевого активатора плазминогена из культуры клеток Bowes меланомы человека [21]. Установка объемом культивирования 40 л позволяла получать ежедневно 4 мг очищенного белка этого активатора. Согласно расчетам, масштабирование процесса до 7000 л обеспечивало ежедневный выход 700 мг очищенного активатора плазминогена, что достаточно для 50–100 пациентов в сутки.

В последние годы прогрессирует генно–инженерная технология получения животных белков путем микробного синтеза, однако это не всегда возможно, т.к. необходимо воспроизведение систем посттрансляционного процессинга. Наконец, предприняты попытки использования культуры тканей (в т.ч. таких высокодифференцированных тканей как нервная или ткань миокарда) для трансплантации [3]. В данном случае имеется ряд сложностей обеспечения специфической трофической поддержки трансплантата.

Естественно, что масштабное использование культур клеток в биотехнологии и для исследовательских целей требует хорошо организованного процесса наработки этих культур.

В Беларуси история развития культур ткани затрагивает два научных учреждения. Масштабная наработка культур тканей, причем, главным образом, перевиваемых была организована в 60–70-х годах под руководством академика АМН СССР В.И. Вотякова на Предприятии по производству бакпрепаратов Белорусского НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава БССР. В отделении культур клеток, которое на протяжении двух десятилетий возглавляла заслуженный врач БССР канд. мед. наук Л.И.Никонович, осуществлялась поточная наработка клеток перевиваемых линий (HeLa, D-6, MA-104, ВНК-21, СОЦ, Кэм, FL, АМН, АМК, ФК, Нер-2, МДСК, Vero, L<sub>929</sub>, собственной перевиваемой линии клеток почки человека), а также первичных (ФЭК, почки человека, мышцы эмбриона человека). Было организовано также производство отечественной питательной среды на основе гемогидролизатов и сыворотки крови для культур ткани, что делало культуры клеток достаточно доступными для широкого использования. Прежде всего, это производство было ориентировано для нужд вирусологии. Однако данные культуры позволяли проводить разнообразные исследования и в других областях медико-биологических наук. Ежемесячная наработка достигала 11 млрд. клеток, которые поставлялись по заказам различных учреждений республики и за ее пределы [11]. В настоящее время в нашей стране нет столь масштабной технологии культур клеток, несмотря на уже созревшие потребности биотехнологического плана. Культивирование ряда перевиваемых линий клеток ведется сейчас в институтах НАН Беларуси и Минздрава Республики Беларусь. Тем не менее, нынешние масштабы далеки от тех, которые были достигнуты 30–40 лет назад.

В Институте физиологии НАН Беларуси в конце 60-х годов было начато культивирование нервной ткани для изучения молекулярно-клеточных основ ее патологии и гистогенеза. Организатором этих работ являлся Б.Я.Вильнер [19,20], под руководством которого получены органные и диссоциированные культуры ганглиев симпатических, спинальных, тригеминальных, гассерова узла, ткани спинного мозга, надпочечников, сокультивирование нервной и мышечной ткани, начата работа по получению культуры ткани сердца [4,5]. Впоследствии на клетках феохромоцитомы РС12 изучались свойства фактора роста нервов [7].

Развертывание масштабной технологии наработки клеток высокодифференцированных тканей выдвигает проблему обеспечения культур 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: фактор роста эпидермиса (EGF), фактор роста нервов (NGF), фактор, продуцируемый головным мозгом (BDNF), CNTF, фактор, продуцируемый глией (GDNF), нейротрофины: NT-3, NT-4. Все они чрезвычайно дороги, что создает трудно разрешимые проблемы в их использовании для биотехнологических целей. В данной ситуации, как мы отмечали ранее [13], 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 трофинов.

Опираясь на представления о кислородзависимом пути активации плазминогена [23–25], в 1999–2012 годы в лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси выполнен комплекс исследований роли компонентов перичеселлюлярного протеолиза – плазминогена (Pg) и стрептокиназы (SK) в жизнедеятельности клеток нервной ткани на органных и диссоциированных культурах симпатических (краниального шейного, шейно-грудного), чувствительных (спинальных) ганглиев, неокортекса и мозжечка, на перевиваемых линиях глиомы С6 и феохромоцитомы РС12, нейробластомы IMR-32.

В настоящей статье изложено краткое обобщение полученных сотрудниками указанной лаборатории результатов собственных экспериментальных исследований действия этих белков на жизнедеятельность клеток нервной ткани.

**Плазминоген** (Pg) – гликопротеин сложной доменной структуры молекулярной массой 72–90 кДа. Основные свойства его молекулы обобщены в нашей статье [10]. Под влиянием активаторов он превращается в плазмин – сериновую трипсиноподобную гидролазу. Компоненты системы Pg-плазмин обнаружены в разнообразных клетках, почти во всех жидкостях организма, ее роль описана в целом ряде процессов на клеточном и тканевом уровнях. Сам зимоген и его высокоаффинные рецепторы обнаружены в гомогенатах головного мозга; в микроглии и нейронах гиппокампа

мышы выявлены плазминоген и его мРНК. Однако роль его в функциональной активности клеток и структур нервной системы остается малоизученной.

**Стрептокиназа (СК)** – мощнейший активатор Pg, синтезируемый отдельными серологическими группами β-гемолитических стрептококков, белок доменной структуры молекулярной массой 45–60 кДа, полностью лишенный остатков Cys, какой-либо гидролазной активности и наделенный выраженной супероксид-конвергирующей способностью [9,24].

Полученные на разнообразных культурах клеток нервной ткани результаты [12–14,16,27], носящие характер абсолютной мировой новизны, раскрывают следующие ранее неописанные в литературе аспекты:

- СК и Pg оказывают прямое, непосредственное через кровоток воздействие на жизнеспособность нейронов и глиоцитов, стимулируя пролиферацию и, в ряде моментов – дифференциацию в условиях отсутствия иных нейротрофических белковых факторов;

- Pg и СК в концентрациях  $\leq 10^{-8}$  М даже при непродолжительном воздействии вызывают существенные изменения метаболизма клеток нервной ткани;

- Pg и СК защищают клетки нервной ткани при повреждающем воздействии гидропероксида, глутамата, анионов АТФ, ионов аммония, при холодовом шоке, токсической гипергидратации клеток нервной ткани, их дегидратации и гипергидратации осмотического характера;

- Pg и СК изменяют электрическую активность нейронов центров ствола головного мозга, отражая функциональные перестройки дыхательного центра;

- Pg и с СК при интеграции их в комплексы с пируваткиназой снимают цитотоксическое действие последней на клетки глиомы.

**Применение в биотехнологии** подразумевает, прежде всего, возможность культивирования клеток нервной ткани на практически не содержащих сыворотки крови питательных средах. Это имеет исключительно важное значение при биохимической очистке нейроспецифических белков, поскольку позволяет исключить присутствие балластных белков сыворотки крови. Следует отметить, что получение рекомбинантных белков не всегда бывает экономически выгодным. В этом плане нами в 2006–2009 г. предложены оригинальные способы культивирования клеток нервной ткани, изложенные в патентах ВУ №№ 8301, 8876, 8877, 12525. Еще одно приложение в медицинской биотехнологии – трансплантация нервной ткани, где для трофической поддержки трансплантируемого материала могут быть применены разработанные способы культивирования. Методом иммуногистохимии установлено также, что клетки глии имеют Pg-связывающие сайты [2], что ранее считали характерным только для нейронов.

Кроме того, до сих пор в литературе дискусируется вопрос о возможности пролиферации нейронов в уже созревшей нервной ткани. Результаты последних экспериментов дают одно из решений стимуляции их пролиферации [1].

Известно, что клетки нервной ткани дифференцируются из предшествующих стволовых соответствующего типа. Однако регуляция такой дифференциации далека от ясности. Ранее нами был выдвинут тезис о чрезвычайно важной проблеме раскрытия роли в этом процессе звена Pg-плазмин и возможности использования СК в качестве эффектора [12].

Следует отметить, что стимуляция роста и активности клеток СК и Pg выявлена нами на культурах ткани миокарда и паратироцитов [15,17].

**В области патоневрологии** очевидна крайняя необходимость выявления особенностей экспрессии синтеза Pg клетками нервной ткани при физиологических и патологических состояниях. Учитывая изменения его молекулы при Pg-патиях – врожденных дефектах (возможно и приобретенных), логичен вопрос о роли изменений экспрессии и дефектов молекулы зимогена в этиологии патологических состояний и летальных исходов (блокада активности дыхательного центра).

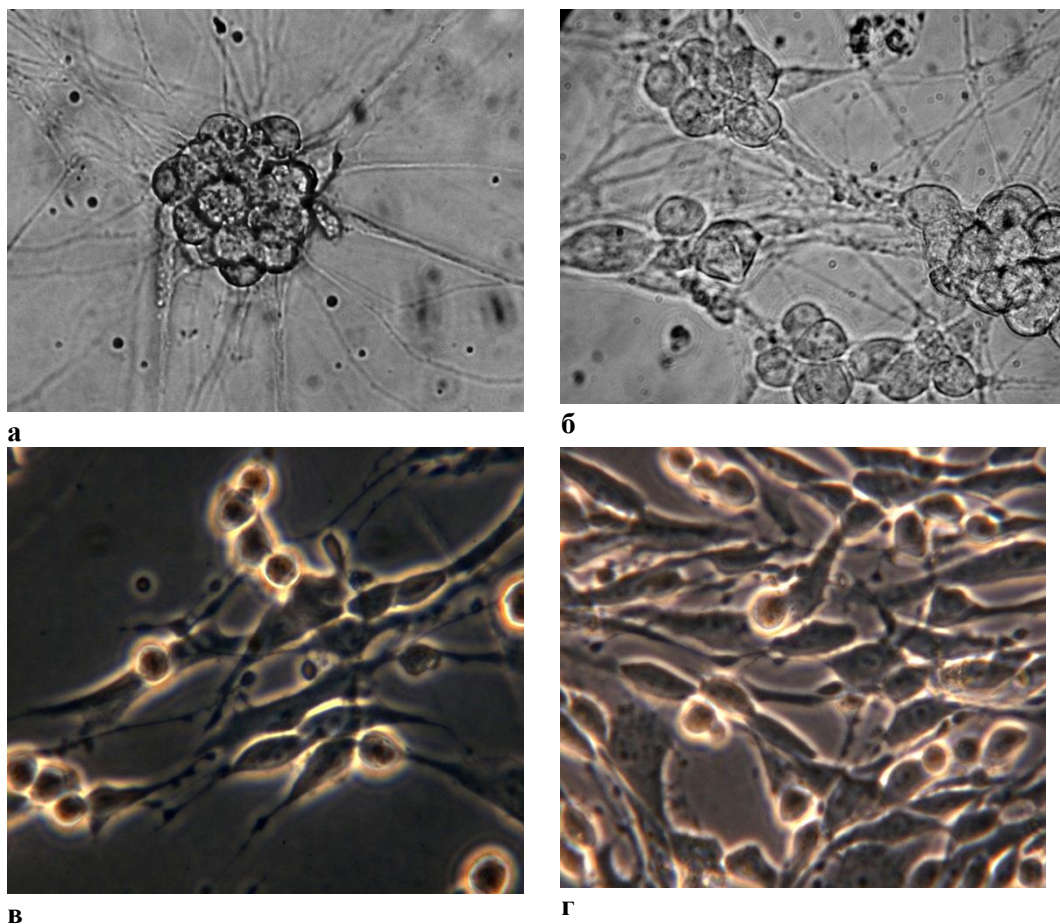
В последние годы считают, что болезнь Альцгеймера является результатом дисбаланса звеньев протеолиза в образовании и катаболизме амилоидного пептида, в которых важную роль играет звено Pg-плазмин. Судя по литературе, прионовая патология также имеет отношение к активации Pg. Проблема коррекции нервной системы при этих состояниях далека от решения. Поэтому чрезвычайно важна проработка возможности реализации протекторного действия СК и Pg на нервную ткань. Совокупность изложенных результатов позволяет обосновать использование препаратов СК по новому назначению [18].

В 2009 г. нами разработаны и предложены приемы блокирования набухания-дегидратации нервных клеток осмотического и токсического происхождения, получены патенты ВУ №№ 14810, 15378, 15379, 15815, 16397, 16399, 16400, 16744, 16745.

**Фармакологический аспект.** Впервые установленное эффекторное действие SK на жизнедеятельность клеток нервной ткани, реализующееся часто в концентрации наномолярного порядка, является чрезвычайно значимым еще в одном плане. Оно открывает в перспективе принципиально иные возможности использования лечебных препаратов SK и P<sub>g</sub>, учитывая наличие таковых в ряде стран. Вырисовывается широкий фронт исследований по проработке в моделях патологических состояний на лабораторных животных путей и схем лечебного применения таких препаратов. Одним из таких путей, возможно, может служить электрофоретическое перемещение к патологическому очагу этих заряженных белковых молекул.

Учитывая наличие у SK выраженной супероксидконвергирующей активности [23–25], было изучено влияние одной из истинных супероксиддисмутаз (SOD) – Cu,Zn–содержащей из эритроцитов на диссоциированные культуры краниально–шейного ганглия новорожденной крысы.

Добавление дисмутазы в концентрациях  $10^{-7}$  и  $10^{-8}$  М уже спустя 24 ч вело к увеличению адгезии клеток к субстрату, что приводило к большей выживаемости культур симпаточитов. В присутствии SOD ускорялось развитие нейронов: вырост отростков, изменение их длины, увеличение размера сомы нервных клеток (рис. 1). Через 7 суток в таких культурах отмечалось значительное количество нейронов, имеющих длинные ветвящиеся отростки, собранные в пучки, развивались многочисленные межнейронные связи. Начиналась также активная пролиферация сопутствующих ненейрональных клеток [8].

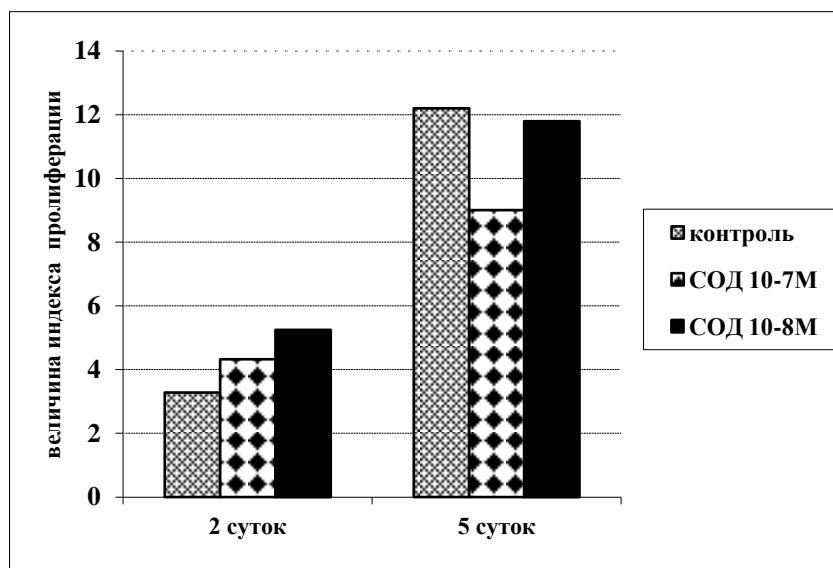


**Рисунок 1 – Влияние добавления эритроцитарной супероксиддисмутазы на культуру клеток нервной ткани [8]:**

**а и б** – диссоциированная культура краниально–шейного ганглия новорожденной крысы, 7 суток, проходящий свет,  $\times 160$ , **а** – контроль, **б** – добавление дисмутазы в конечной концентрации  $10^{-8}$  М; **в** и **г** – культура глиомы С6; фазово–контрастная микроскопия,  $\times 40$ ; **в** – контроль, **г** – добавление дисмутазы в конечной концентрации  $10^{-7}$  М

Выявлено стимулирующее влияние SOD на рост и развитие органной культуры спинальных ганглиев новорожденных крыс (рис.2). Добавление SOD в концентрации  $10^{-7}$  М и  $10^{-8}$  М через 72 ч вызвало усиление пролиферации клеток глиомы С6 в 2,0 и 1,5 раза и рост уровня белка в них на 31

и 14% соответственно ( $p < 0,05$ ). Лишь при концентрации энзима  $10^{-7}$  М его эффект сопровождался ростом уровня РНК и ДНК в клетках на 42 и 17% соответственно [8]. Этот эффект снижался к 48 ч и практически исчезал через 5 сут (рис. 1). SOD оказала негативное влияние на нейробластому IMR-32: не способствовала дифференцировке, вызывая токсический эффект, вплоть до гибели клеток через 72 ч при обеих концентрациях SOD [8].



**Рисунок 2 – Изменения величины зоны роста спинального ганглия новорожденной крысы при внесении в культуральную среду супероксиддисмутазы [8]**

Поскольку SK и P<sub>g</sub> образуют устойчивые эквимольные комплексы с пируваткиназой (PK) – одним из ферментов гликолиза [26] изучено ее действие на культуры глиомы С6 и нейробластомы IMR-32. Выявлено стимулирующее действие добавки PK в среду культивирования клеток нейробластомы IMR-32. Причем стимулирующее действие PK на клеточную пролиферацию и их жизнеспособность проявлялось даже сильнее, чем действие P<sub>g</sub> и SK [13]. Через 24 ч культивирования нейробластомы с  $10^{-7}$ – $10^{-11}$  М PK не выявлено изменений пролиферации клеток нейробластомы, тогда как уровень белка и РНК (но не ДНК) увеличился на 78–96 и 100–130% соответственно. Через 72 ч в присутствии  $10^{-7}$ – $10^{-11}$  М PK индекс пролиферации возрос на 127–249%. В присутствии PK наблюдали также увеличение содержания белка, РНК и ДНК в клетках IMR-32 на 154–264, 171–231 и 132–281% соответственно. Вместе с тем добавление энзима вело к деструкции клеток глиомы С6 [13].

Представленная совокупность материалов вносит крупный вклад в биотехнологию, нейробиологию и патоневрологию, биологию протеолиза. Очерчен ряд новых проблем фундаментального и прикладного плана, разработка которых будет способствовать прогрессу ряда биологических и медицинских наук.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Балашевич Т.В., Никандров В.Н. // В кн.: «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды. Всеросс. конф. с международ. участием. Тезисы докл.», СПб, 2010 С. 24.
2. Балашевич Т.В., Никандров В.Н., Лукашевич В.С // Доклады НАН Беларуси, 2010, т. 54, № 5. С. 91–94.
3. Балашко С.И., Колядко А.Н., Лукашевич В.С. и соавт. // Изв. НАН Беларуси. сер. мед.-биол. наук, 2003, № 2. С. 113–121.
4. Вильнер Б.Я. // Усп. совр. биол., 1987, т. 103, № 2. С. 243–254.
5. Вильнер Б.Я., Пашковская М.И., Лущицкая Н.И. // Изв. АН БССР. сер. биол., 1973, № 1. С. 118–122.
6. Гриффитс Дж.Б. // В кн.: Биотехнология клеток животных. Т. 2. Пер. с англ. М.: Мир, 1989. С. 5–16.
7. Калюнов В.Н. // Биология фактора роста нервной ткани. Минск: Наука и техника, 1986. 208 с.
8. Лукашевич В.С., Полукошко Е.Ф., Романовская А.А. и соавт. // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. 2006, №1. С. 98–104.
9. Никандров В.Н. // Биоорг. химия, 1994, т. 20, № 2. С. 169–181.
10. Никандров В.Н. // Новости мед.-биол. наук. 2004, № 3. С. 127–146.

11. Никандров В.Н. // В кн.: «Гуманизация обучения специалистов медико-биологического профиля. Матер. научно-практ. семинара с международн. участием», Минск, 2006. С. 42–45.
12. Никандров В.Н., Жук О.Н. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2011, т. 6, № 1. С. 36–48.
13. Никандров В.Н., Жук О.Н., Гронская Р.И. и соавт. // In: “Materials, methods and technology. Scientific articles 2007”. Sci. Invest. LTD–branch Bourgas. Bulgaria, 2007. P. 48–66.
14. Никандров В.Н., Жук О.А., Гронская Р.И. и соавт. // Биомед. химия, 2008, т. 54, № 2. С. 192–200.
15. Никандров В.Н., Жук О.Н., Полукошко Е.Ф. и соавт // Новости мед.-биол. наук, 2010, № 1. С. 30–34.
16. Никандров В.Н., Жук О.Н., Пыжова Н.С. и соавт. // Изв. НАН Беларуси. сер. мед. наук. 2008. № 1. С. 85–97.
17. Никандров В.Н., Полукошко Е.Ф., Лукашевич В.С. и соавт // Доклады НАН Беларуси, 2005, т. 49, № 2. С. 73–76.
18. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Жук О.Н. // В кн.: «Белорусские лекарства. Материалы междунар. научно-практ. конфер.». Минск, 2010. С. 156–159.
19. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / Под ред. Б.Н. Вепринцева. М.: Наука, 1976. 352 с.
20. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы: Изд. 2–е перераб. / Под ред. Б.Н. Вепринцева, И.В. Викторова, Б.Я. Вильнера. М.: Наука, 1988. 318 с.
21. Kluff C., van Wezel A.L., van der Verden C.A.M. et al. // Adv. Biotechnol. Proc. 1973, Vol. 2. P. 97–110.
22. Lee Y.–R., Yap P.–R., Teoh A.–P. // Biotechnol. Bioeng. 1995, Vol. 45. P. 18–26.
23. Nikandrov, V.N., Pyzhova, N.S., // In: 18<sup>th</sup> FEBS Meeting. Abstracts. Ljubljana, 1987. P. 84.
24. Nikandrov V.N. // Int. J. Biochem. 1992, Vol. 24. P. 47–53.
25. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. // Cell. Mol. Biology. 2006, Vol. 52, No 4. P. 30–39.
26. Nikandrov V.N., Murashko O.N., Vorobyova G.V. et al. // Letters in Peptide Science. 1997. Vol. 4. P. 497–502.
27. Zhuk O.N., Nikandrov V.N. // Neurosci. and Behavior. Physiol., 2006, Vol. 36, № 8. P. 841–845.