

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРА ЕСТЕСТВЕННОГО ГИПОБИОЗА, ПЕПТИДА TSKY
НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ
LYMNAEA STAGNALIS В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Ивличева Н.А.¹, Цыганова В.Г.², Рогачевский В.В.¹, Крамарова Л.И.², Зиганишин Р.Х.³
Гахова Э.Н.¹

¹Институт биофизики клетки РАН, Пущино

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

³Институт биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Введение. Решение вопросов низкотемпературной и околонулевой консервации биоматериала связано с использованием криопротекторов различной химической природы. Их присутствие способствует сохранению жизнеспособности замораживаемого объекта. Известно, что в состоянии зимней спячки организм не только способен адаптироваться и противостоять холодовому стрессу, но и защищён от действия различных инфекций, онкологических заболеваний, атрофии мышц и радиации. [1, 2, 3, 4]. Идея использовать природные факторы адаптации позвоночных животных к околонулевым и сверхнизким температурам для сохранения тканей, органов и организмов позволит создать эффективную технологию подготовки биоматериала для криомедицины и криобиологии [5]. Исследование нейропротекторных механизмов у зимоспящих животных открывает новые терапевтические стратегии для сохранения мозга человека в экстремальных условиях, лечению инсульта, травм мозга, различных нейродегенеративных болезней, а также улучшения условий хранения органов до трансплантации. Наряду с поиском нетоксичных и эффективных криозащитных средств в настоящее время накапливается все больше данных, что перед глубоким замораживанием или трансплантацией ткани и органов большое значение имеет физиологическое состояние клеток. Следовательно, основное внимание должно уделяться тщательной подготовке объектов, предназначенных для длительного околонулевого и низкотемпературного сохранения. Внимание исследователей привлекло использование пептидов выделенных из мозга зимоспящих животных, которые обеспечивают выживание организма в экстремальных условиях [6, 7, 8].

Целью нашей работы было выявить влияние пептида на физиологическое состояние изолированных нейронов прудовика (*Lymnaea stagnalis*) в клеточной культуре.

Материалы и методы. Пептид TSKY был синтезирован классическим методом в растворе [7]. Изолированное околонулевое нервное кольцо прудовика предварительно инкубировали 60 мин. в растворе питательной среды (20% L-15) с добавлением исследуемого пептида TSKY в концентрации 1×10^{-5} М, 1×10^{-6} М и 1×10^{-7} М (при 22-24°C и при 4-8°C). Культивирование осуществляли при комнатной температуре в культуральной среде, применяемой для культивирования нейронов прудовика (КСНП) содержащей 20% L-15, гентамицин, NaCl – 90 мМ, KCl – 5 мМ, CaCl₂ – 2 мМ, MgCl₂ – 1.5 мМ, Tris-HCl – 0.25 мМ, pH 7.6-7.9 [9]. Жизнеспособность нейронов в культуре, оценивали с помощью световой микроскопии по морфологическим критериям: нейроны с ярко окрашенным ядром или диффузно окрашенными ядром и цитоплазмой считали поврежденными. Поврежденные нейроны также легко определялись по явным признакам лизиса, вакуолизации цитоплазмы. При добавлении метиленового синего цитоплазма и ядро погибших нейронов окрашивалась в синий цвет, в то время как живые клетки не окрашивались. Все полученные данные, представлены как среднее из 3-х экспериментов, каждый из которых был проведен в двух повторах.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований показали, что и в контрольных экспериментах (без предварительной обработки мозга прудовика пептидом TSKY) и с предварительной обработкой пептидом TSKY при различных температурах,

нейроны после высева в культуру способны не только сохранять жизнеспособность, но и давать отростки (рис. 1).

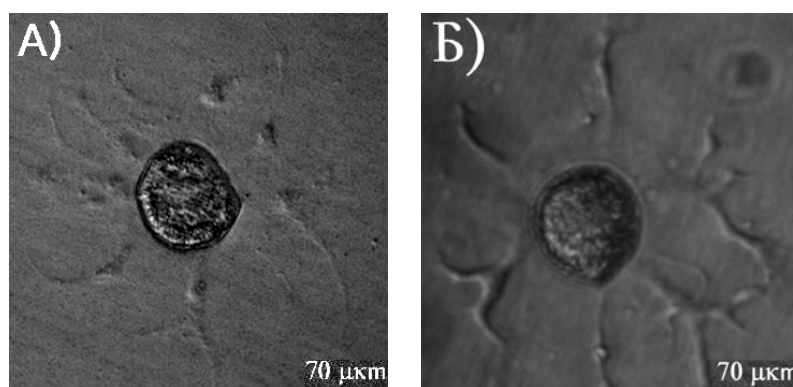


Рис.1. Изолированный нейрон из мозга прудовика *L. stagnalis*, после 24 часов культивирования: **а)** без предварительной обработки мозга пептидом; **б)** с предварительной инкубацией мозга в растворе с пептидом TSKY в течение 60 мин.

Однако, как показали наши эксперименты, количество нейронов, способных формировать отростки, уменьшается после предварительной 60-минутной инкубации мозга при температуре 4-8°C до 50%, по сравнению с экспериментами, проведенными при комнатной температуре (66.6%) (рис.2).

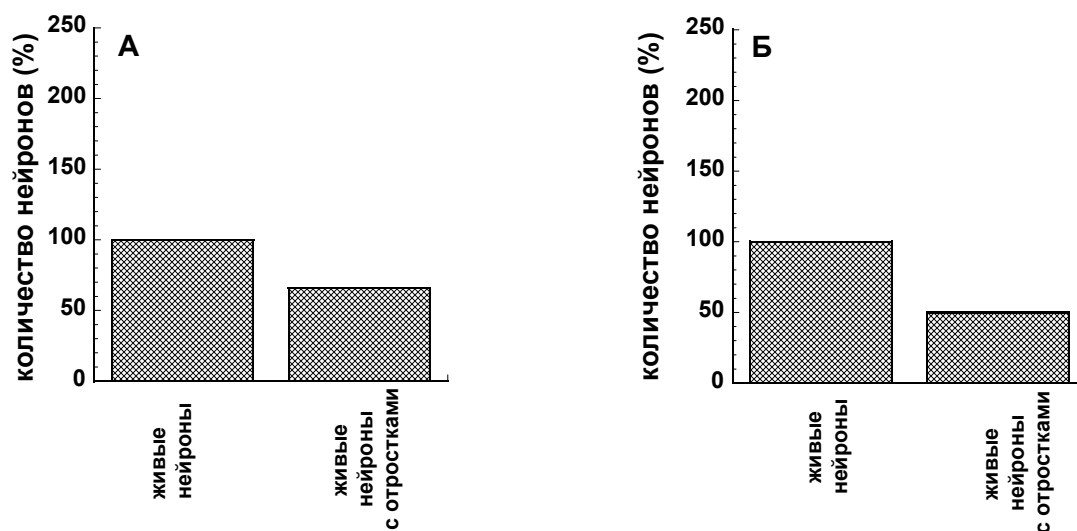


Рис.2. Количество живых нейронов и нейронов с отростками через 24 часа культивирования в КСНП. Предварительная инкубация изолированного мозга моллюска при 22-24°C (А) и при 4-8°C (Б), в течение 60 мин.

Инкубация изолированного мозга моллюска при температуре 22-24°C.

а) После предварительной инкубации мозга моллюска при температуре 22-24°C, в растворе с различными концентрациями пептида TSKY, общее количество живых нейронов при культивировании увеличивается по сравнению с контролем и составляет 172,2% при 1×10^{-5} М, 154,4% при 1×10^{-6} М и 157,2% при 1×10^{-7} М (рис.3а).

б) После предварительной инкубации мозга моллюска при температуре 22-24°C, в растворе с различными концентрациями пептида TSKY, общее количество регенерировавших нейронов с отростками через 24 часа культивирования уменьшается по сравнению с контролем и составляет 30,8% при 1×10^{-5} М, 29,17% при 1×10^{-6} М и 13,3 % при 1×10^{-7} М (рис.4а).

Инкубация изолированного мозга моллюска при температуре 4-8°C.

а) После предварительной инкубации мозга моллюска при пониженной температуре 4-8°C, в растворе с различными концентрациями пептида TSKY, общее

количество живых нейронов при культивировании увеличивается значительно больше по сравнению с контролем и составляет 357,5% при $1 \times 10^{-5} \text{M}$, 322,5% при $1 \times 10^{-6} \text{M}$ и 205% при $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (рис.3б).

б) После предварительной инкубации мозга моллюска при пониженной температуре 4-8°C, в растворе с различными концентрациями пептида TSKY, формирование нейрональных отростков в первые сутки культивирования наблюдалось у 48% клеток при $1 \times 10^{-5} \text{M}$, 24% при $1 \times 10^{-6} \text{M}$ и 29% при $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (рис.4б), что значительно превышает результаты по сравнению с экспериментами с обработкой мозга исследуемым пептидом при температуре 22-24°C.

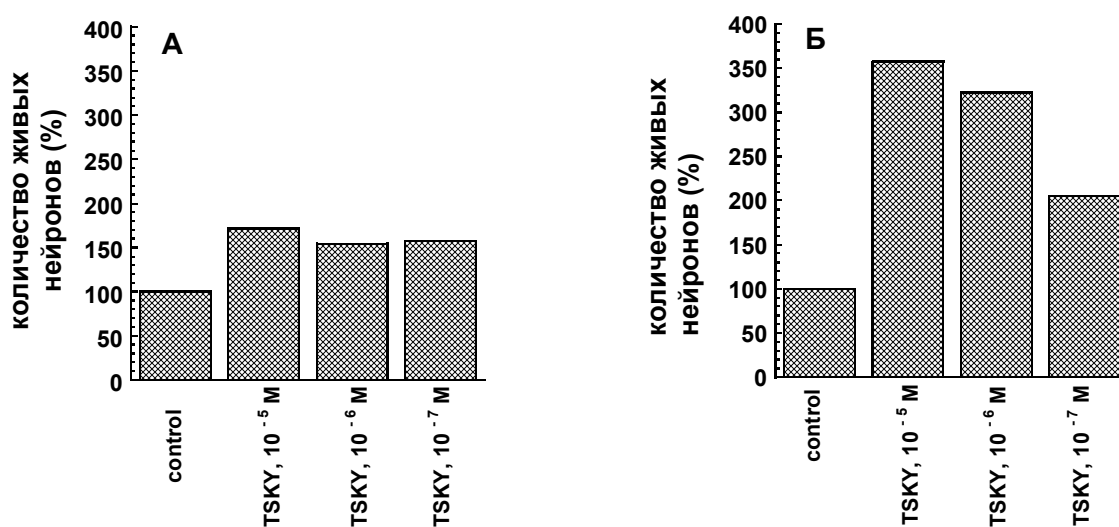


Рис.3. Количество живых нейронов через 24 часа культивирования. Предварительная инкубация мозга моллюска в растворе, содержащем TSKY в различных концентрациях: $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $1 \times 10^{-6} \text{M}$ и $1 \times 10^{-7} \text{M}$ при 22-24°C (А) и при 4-8°C (Б). В контрольных экспериментах предварительная инкубация мозга моллюска проводилась в растворе не содержащем пептид. На графиках представлены средние значения из 3-х экспериментов, каждый из которых был проведен в двух повторах.

Наши эксперименты показали значительное увеличение общего количества живых нейронов в культуре с предварительной обработкой мозга пептидом TSKY. Однако, общее количество живых нейронов с отростками может как увеличиваться, так и уменьшаться при различных температурных условиях инкубации мозга. Известно, что охлаждение до 12°C приводит к гибели нейронов у некоторых видов животных [10]. В наших экспериментах влияние околонулевой температуры в сочетании с обработкой мозга пептидом TSKY во всех анализируемых концентрациях дало положительные результаты на регенерационную способность нейронов формировать отростки. Однако, влияние пептида на способность изменять общее количество живых клеток значительно превышает его эффект на общее количество нейронов с отростками. Нам известно, что данный пептид TSKY, выделенный из мозга зимоспящих животных, находящихся в состоянии спячки, содержится в концентрации приблизительно в 2 раза выше его концентрации в мозге активных животных и способен значительно ингибировать скорость сердечных сокращений у выделенных 36-часовых куриных эмбрионов [11]. Было также продемонстрировано, что охлаждение мышей с предварительно введенным пептидом TSKY индуцировало у животных длительную гипотермию [12]. Таким образом, если обратиться к полученным нами результатам, то можно предположить, что нервные клетки моллюска при обработке данным пептидом, могут переходить в новое физиологическое состояние (или состояние гипометаболизма), в котором нейроны могут находиться длительный период без потери жизнеспособности, и с малым проявлением регенерационных свойств, в нашем случае, без формирования и развития нейрональных отростков. Поэтому наряду с поставленной нами задачей - тщательной подготовкой объектов, предназначенных для длительного околонулевого а также

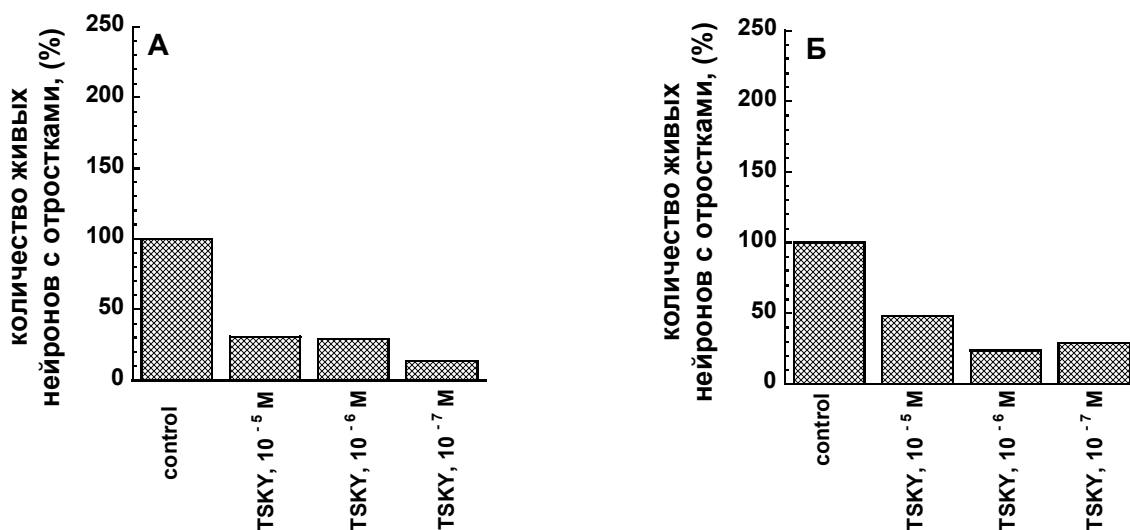


Рис.4. Количество живых нейронов с нейрональными отростками в первые сутки культивирования *in vitro*. Предварительная инкубация мозга моллюска в растворе при 22-24°C (А) и при 4-8°C (В) с TSKY в концентрациях $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $1 \times 10^{-6} \text{M}$ и $1 \times 10^{-7} \text{M}$. В контрольных экспериментах предварительная инкубация мозга моллюска проводилась в растворе не содержащем пептид. На графиках представлены средние значения из 3-х экспериментов, каждый из которых был проведен в двух повторах.

низкотемпературного сохранения, закономерно возникает следующая задача - как вывести клетку из подобного гипометаболического состояния. Это особенно актуально и перспективно при постановке экспериментов в условиях замораживания-оттаивания при сверхнизких температурах. Поэтому нам представляется вполне обоснованным ожидать положительный эффект на выход жизнеспособных нервных клеток способных формировать отростки после процедуры околонулевого сохранения и/или криоконсервации при использовании пептидов, стабилизирующих клеточный гомеостаз и помогающим клеткам и тканям выйти из состояния гипобиоза. Таким образом, мы показали, что пептид TSKY обладает потенциальными криопротекторными свойствами. Обнаружение криозащитных агентов позволяет по новому подойти к поиску новых эффективных и безопасных способов криоконсервации нервных клеток и выяснению механизмов их устойчивости к низким и сверхнизким температурам.

Работа выполнена при поддержке РФФИ 10-04-01319-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kemper G.B., Ruben R.L. // *Comp. Biochem. Physiol.*, 1982, 73:445–50;
2. Harlow et al., // *Nature*, 2001, 409:997;
3. Sharapov et al. // *Мycopathologia*, 1984, 84:77–80;
4. Rouke et al. *Hypometabolism in Animals. Hibernation, Torpor and Cryobiology* //Eds Lovergrove B.G., McKechnie A.E. Pietermaritzburg: Interpack Books. 2008. P. 57–65;
5. Крамарова Л.И., Гахова Э.Н. Карнаухов В.Н. // *Биофизика живой клетки*, 1994, 6:47–55;
6. Kramarova L.I., Ziganshin R.Y., Kokoz Y. M., Bronnikov G. E. In Book: “Recent Research Developments in Endocrinology” (Ed. by S. G. Pandalai), *Research Signpost*, 2004, 4(2):227–63;
7. Зиганшин Р.Х. и др. // *Биоорганическая химия*, 1994, 20(8-9):899-918;
8. Крамарова Л.И., Зиганшин З.Х., Гахова Э.Н. // *Биоорганическая химия*, 2009, 35(5):597-609;
9. Ивличева Н.А., Дмитриева Е.В, Костенко М.А., Гахова Э.Н. // *Биофизика*, 2004, 49(4):710-714;
10. Tymianski M. et al. // *J. of cerebral blood flow and metabolism* (1998) 18(8): 848-67.
11. Kramarova L. et al. // In book: *Adaptation to the cold*, ed. by Geiser F., Hulbert A. J., and Nicol S.C., Univ. of New England Press, Armidale, 1996. P. 379-383;
12. Игнатъев Д.А., Воробьев В.В., Зиганшин Р.Х. // *Высш. нервн деят.*, 2005, 55(1):84-90.