

БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

ИНДУКЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ СЕТЧАТКИ

В.Х.Хавинсон, В.В.Малинин, С.В.Трофимова, В.Н.Земчихина*

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН; *Институт биологии гена РАН, Москва

Исследовали индукционное влияние ретиналамина — полипептидного препарата, выделенного из сетчатки, на полипотентные клетки эктодермы ранней гаструлы *Xenopus laevis*. В зависимости от концентрации ретиналамина в эктодерме ранней гаструлы развивается нейральная дифференцировка, включая мозг, сетчатку, пигментный эпителий.

Ключевые слова: ретиналамин, индукция, эктодерма ранней гаструлы, дифференцировка

Проблемы возникновения множества клеточных типов в процессе развития организма из оплодотворенной яйцеклетки, т.е. проблемы дифференцировки тканей и обуславливающих ее молекулярных факторов, всегда являлись одними из труднейших и интереснейших в биологии развития. В результате тщательного биохимического анализа Н.Тiedemann в 1956 г. установил, что в основе индукции лежит действие низкомолекулярных белков. Дальнейшие исследования были направлены на их более точную идентификацию. Они показали, что этим веществом является уже известный естественный продукт сосудов взрослых млекопитающих — активин ($\text{tgf-}\beta$) [10,12,14]. Однако это открытие не только завершило многолетние труды, но и указало на определенные проблемы. Кроме активина ($\text{tgf-}\beta$) мезодермальные образования индуцируют многие ростовые факторы. Их действие различается тем, что в отношении осей тела позвоночных одни преимущественно индуцируют ткани верхних уровней, а другие — нижних. Тот же эффект может достигаться применением различных концентраций одного и того же вещества [11]. Помимо метода биохимического выделения искомым индукционных факторов, нами был применен метод влияния белками, секретируемыми клетками живых тканей, трансфильтрово [4,7,13] или прямо на полипотентную ткань эктодермы ранней гаструлы (ПТЭ), что позволяет наиболее точно исследовать действие тканеспецифических факторов [6,7]. Возникает вопрос, насколько присутствие всего набора различных тканеспецифических

дифференцировок может быть обусловлено веществами типа активина ($\text{tgf-}\beta$) и других ростовых факторов, или в этом принимают участие и другие белки.

В этой связи необходимо отметить появление отдельного класса препаратов — пептидных биорегуляторов, выделенных из различных органов и тканей и содержащих наборы полипептидов с молекулярной массой 1–10 кД [8,9]. При выполнении ряда работ, проведенных на клеточных культурах, установлена тканеспецифичность действия пептидных биорегуляторов [1–3,5]. Возможно, что набор пептидов, полученный из определенной ткани или органа, имеет в своем составе те пептиды, которые опосредуют такое явление, как аутоиндукция — поддержание тканевой специфичности в процессе функционирования тканей взрослого организма.

Целью нашей работы являлось изучение индукционной активности пептидного биорегулятора ретиналамина, выделенного из сетчатки глаза, на ПТЭ шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* в различных концентрациях.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве экспериментального объекта использовали зародыши шпорцевых лягушек *X. laevis*. Икру получали при помощи искусственной стимуляции самца и самки гонадотропином. Для этого из имеющегося стада лягушек отбирали пары, которые в течение последних 6 мес давали полноценную икру (количество живых ик-

Распределение (%) по типам тканей, индуцированных ретиналамином в ПТЭ ранней гастролы

Показатель		Концентрация ретиналамина, нг/мл						
		0 (конт- роль)	200	100	50	20	10	2
Число исследованных/учтенных при анализе культур		20/20	90/64	90/85	90/60	90/40	90/80	90/70
Тип ткани	атипичный эпидермис	100	100	90	90	100	83	92
	эпидермис	—	39	—	15	40	42	38
	меланофоры	—	—	40	12	20	10	8
	нервная	—	—	12	—	—	33	15
	мозг	—	—	—	12	—	8	8
	сетчатка	—	—	—	—	—	3	—
	пигментный эпителий	—	—	—	—	—	1	—

ринок не менее 70%). Затем отобранным самцу и самке вводили в спинные лимфатические мешки по 200 и 400 ед. гонадотропина соответственно.

Зародышей на необходимой стадии развития стерилизовали в 70% спиртовом растворе в течение 30 с, затем промывали 2 раза в стерильной воде и помещали в стерильную чашку Петри диаметром 3.5 см со стерильным солевым раствором для амфибий Ниу-Твитти с добавлением антибиотиков. После стерилизации с зародышей снимали все оболочки и приступали к выделению необходимых для опытов участков тканей.

В качестве тест-системы (полипотентной ткани, способной под воздействием того или иного индуцирующего агента приступить к опреде-

ленной дифференцировке) использовали эктодерму ранней гастролы *X. laevis*. Из крыши полости дробления ранних гаструл *X. laevis* на стадии 10.5 вырезали участки, не захватывая краевую эктодерму, которая благодаря тангенциальному влиянию окружающих ее частей могла быть частично проиндуцирована. Эти участки помещали в испытываемые растворы и выдерживали в течение 1 ч, пока они не сворачивались в замкнутые пузырьки. Далее эти свернутые пузырьки переносили в стерильный раствор Ниу-Твитти для амфибий, содержащий антибиотики, и культивировали в последнем 4-5 сут при 20°C в инкубаторе. В качестве контроля в стерильном солевом растворе Ниу-Твитти инкубировали крыши полости дробления ранних гаструл *X. laevis* на стадии 10.5 также в течение 4-5 сут. Затем экс-



Рис. 1. Культура эктодермы ранней гастролы, развившейся через 5 сут после воздействия на нее ретиналамина в концентрации 2 нг/мл, время экспозиции 1 ч. Стрелкой указан мозг.

плантаты фиксировали жидкостью Буэна, проводили через ряд спиртов, готовили срезы толщиной 5 мкм и окрашивали азокармином с докраской по Мэллори.

Исследовали стандартный раствор ретиналамина в концентрациях 200, 100, 50, 20, 10 и 2 нг/мл. С каждой концентрацией ставили по 30 культур, в качестве контроля — 20 культур. В контрольных культурах развился лишь атипичный эпидермис.

Поскольку в работе необходимо было учесть зависимость восприятия индукционного сигнала полипотентными клетками от геометрии ткани в момент восприятия, в I серии было использовано несколько схем постановки опыта.

В первом варианте эктодерму ранней гастролы стадии 10.5 помещали в испытуемый раствор активной стороной вверх, где она постепенно сворачивалась в течение 1 ч; в двух других вариантах эктодерму, уложенную активной стороной на фильтр или наверх, прижимали грузом, что не давало ей возможности свернуться ранее 1 ч экспозиции. Далее свернувшуюся или несвернувшуюся эктодерму (после снятия груза) помещали в физиологический раствор Нью-Твитти для амфибий с антибиотиками и культивировали, как указано выше.

Обработка результатов I серии опытов показала, что геометрия ткани в момент восприятия

индукционного сигнала не влияет на возникающую дифференцировку ткани, поэтому следующие 2 серии опытов ставили со свернувшейся эктодермой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под действием ретиналамина отмечена нейральная индукция, включая мозг, сетчатку, пигментный эпителий (таблица; рис 1; рис. 2, а). Процент проиндуцированных эктодерм (около 12-15%) невысок, но специфичен для пептидов.

При воздействии ретиналамина в концентрации 50 нг/мл в ряде случаев не только развивался мозг, но, по всей видимости, в его составе возникал и элифиз, однако данное предположение требует подтверждения специфическими иммунохимическими методами исследования. После инкубации с ретиналамином в концентрации 10 нг/мл лишь в 2 культурах из 80, взятых в исследование, развилась сетчатка, и в 1 — пигментный эпителий (рис. 2, б).

Сопоставляя данные наших исследований с результатами работ, в которых изучалось влияние пептидных биорегуляторов на клеточные культуры, необходимо отметить, что при влиянии индукционных белков в концентрациях 10 нг/мл и ниже индукционный ответ практически не наблюдался. При исследовании ретиналамина ока-

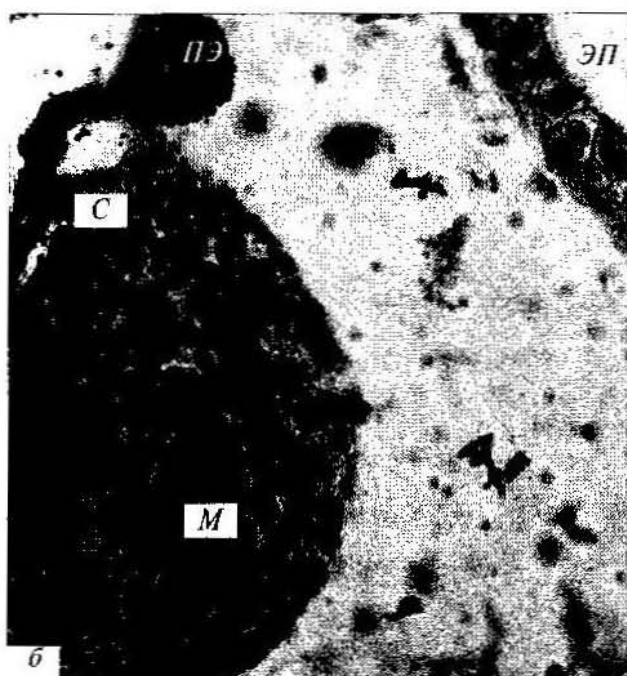
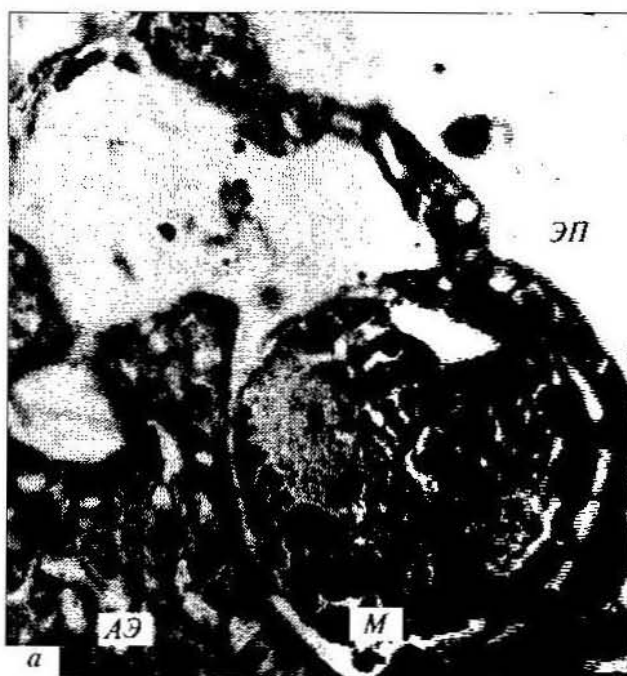


Рис. 2. Гистологические срезы (5 мкм) культуры эктодермы ранней гастролы, развившейся через 5 сут после воздействия на нее ретиналамина в концентрации 2 (а) и 10 нг/мл (б), время экспозиции 1 ч, $\times 250$. АЭ — атипичный эпидермис, ЭП — эпидермис. М — мозг, С — сетчатка, ПЭ — пигментный эпидермис.

зались активными концентрации 50, 10 и 2 нг/мл, т.е. имеет место непрямая зависимость индукционного эффекта от концентрации индуцирующего фактора. Причем тканеспецифическая дифференцировка отмечается при воздействии ретиналамина в минимальных исследуемых концентрациях.

Таким образом, воздействие органных пептидов на полипотентные и стволовые клетки может рассматриваться как один из путей направленной тканеспецифической дифференцировки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В.Н., Хавинсон В.Х., Ашмова И.Н. и др. // Бюл. exper. биол. 2001. Т. 133, № 2. С. 199-202.
2. Анисимов С.В., Бохетер К.Р., Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. // Там же. № 3. С. 340-347.
3. Бродский В.Я., Хавинсон В.Х., Золотарев Ю.А. и др. // Изв. РАН. Сер. биол. 2001. № 5. С. 517-521.
4. Голубева О.Н., Лопашов Г.В. // Докл. РАН. 1996. Т. 348. № 4. С. 560-563.
5. Гончарова Н.Д., Хавинсон В.Х., Лапин Ю.А. // Бюл. exper. биол. 2001. Т. 131, № 4. С. 466-468.
6. Земчихина В.Н., Костюк Р.В., Новикова З.В., Лопашов Г.В. // Генетика. 2000. Т. 36, № 11. С. 1546-1552.
7. Лопашов Г.В., Земчихина В.Н. // Успехи соврем. биол. 2000. Т. 120, № 6. С. 540-549.
8. Хавинсон В.Х. // Бюл. exper. биол. 2001. Т. 132, № 8. С. 228-229.
9. Хавинсон В.Х., Малинин В.В., Чалисова Н.И., Григорьев Е.И. // Успехи геронтол. 2002. Вып. 9. С. 95-100.
10. Asashima M., Nakano H., Shimada K. et al. // Roux Arch. Devel. Biol. 1990. Vol. 198. P. 330-335.
11. Asashima M. // Dev. Growth Differ. 1994. Vol. 36. P. 343-356.
12. Chertov O.Yu., Krasnosel'skii A.L., Bogdanov M.E., Hoperskaya O.A. // Biomed. Sci. 1990. Vol. 1. P. 499-506.
13. Lopashov G.V., Golubeva O.N., Zviadadze K.G. // Differentiation. 1997. Vol. 61. P. 237-242.
14. Smith J.C., Price B.J.M., van Nimmen K., Huylebroek D. // Nature. 1990. Vol. 345. P. 729-731.

Получено 29.07.02