

© Ц.С. Тенчева, И.Р. Панов, 2007
УДК 611.018.8

Ц.С. Тенчева¹ и И.Р. Панов²

ВНУТРИМОЗГОВОЕ РАЗВИТИЕ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ С6 КРЫСЫ ПОСЛЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НЕЙРОПЕПТИДОВ И ИНГИБИТОРА МАРК

¹ Институт физиологии Болгарской академии наук, ² Госпиталь Университета Лозенец, г. София

Исследовали инвазивный рост, пролиферацию и транскрипционную регуляцию клеток глиомы С6, обработанных эндотелином-1 и PD98059 специфическим ингибитором ERK1/2. Для исследования пролиферации клеток глиомы С6 в различных условиях роста они были предварительно обработаны *in vitro* эндотелином-1 и имплантированы в мозг. Исследования *in vitro* показали, что PD98059 ингибирует пролиферацию культивируемых клеток глиомы С6 и вызывает активацию транскрипционных факторов E2F1 и Мус-Мах. Эндотелин-1 значительно усиливает пролиферацию клеток глиомы С6. Модель, использованная в этом исследовании, является экспериментальной, и может раскрыть специфические особенности поведения *in vitro* культивированных инвазивных клеток.

Ключевые слова: клетки глиомы, пролиферация, трансплантация.

В настоящее время все возрастает число доказательств того, что нейропептиды оказывают действия как регуляторы роста и пролиферации нервных и ненервных клеток. Известно, что Rb/E2F-путь является критическим в регуляции начала репликации ДНК [7, 8]. Транскрипционные факторы E2F и с-Мус служат наиболее мощными регуляторами клеточного цикла у высокоорганизованных эукариотов. Показана роль Мус в контроле активации генов E2F1, E2F2 и E2F3 и предположено, что дисрегуляция Мус связана с различными способами активации E2F/Rb-пути [9]. Накоплено много данных, свидетельствующих о том, что MEK/ERK-каскад участвует в регуляции клеточного роста и дифференцировки различных типов клеток [4, 5, 11]. Митогенактивируемые протеинкиназы (МАРК) и их активатор образуют центральные элементы сигнальных трансдукционных путей, которые иницируют и активируют транскрипционные факторы в ядре и в других структурах клетки. Внеклеточный сигнально-регулируемый киназный (ERK-) каскад, первая МАРК система, характерная для клеток млекопитающих, играет роль в развитии и в адаптивных ответах постмитотических клеток [3]. ERK контролируют клеточную пролиферацию и морфологическую трансформацию путем фосфорилирования как ядерных, так и цитоплазматических веществ, включая транскрипционные факторы [3]. Эндотелины являются наиболее сильными из известных вазоконстрикторов у млекопитающих, причем эндотелин-1 вызывает чрезвычайно сильные и продолжительные ответы артерий мозга *in vivo* и *in vitro* [10]. Эндотелин-1 является наиболее

изученным пептидом в этом семействе, а его специфические рецепторы были идентифицированы в различных типах клеток, включая клетки мозга. Клетки астроцитомы С6 крысы идентифицированы как клетки-мишени для эндотелина-1 с высокой аффинностью рецепторов. Установлено, что эндотелин-1 оказывает митогенное действие на разнообразные клетки-мишени, включая первичные астроциты крысы и клетки астроцитомы С6 [6]. Астроцитомная линия клеток глиомы С6 была использована как модельная система для изучения нейротрофических воздействий, вызываемых такими митогенами, как эндотелин [2, 6].

Цель настоящей работы — исследование влияния культивирования *in vitro* клеток глиомы С6, обработанных митогенным нейропептидом эндотелином-1 или специфическим MEK-ингибитором, на их инвазию, нормальное или патологическое развитие при трансплантации в определенные области мозга.

Материал и методы. *Культура клеток:* клетки глиомы С6BU-1 крысы (American Type Culture Collection, Rockville, MD, США) (пассажи 48–55) были выращены в 60-миллиметровых культуральных чашках в DMEM-среде с 5% сыворотки плодов коровы (FBS). Клетки культивировали в течение 48 ч с последующей обработкой эндотелином-1 (50 нМ) в течение 18 ч или ингибиторами в течение 60 мин. Клетки отмывали однократно в среде DMEM. После центрифугирования в течение 2 мин при 1000G клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере и 2 мкл суспензии, содержащей 1×10^6 клеток, были использованы для корково-архноидальной имплантации.

Включение ³H-тимидина. Клетки глиомы С6 помещали в чашки с 24 ячейками и обрабатывали эндотелином-1 (50 нМ) или MEK-специфическим ингибитором PD98059 (10 мкМ),

или ингибитором протеинкиназы с Go6976 (1 мкМ) в течение 60 мин до добавления 1 мкCi ^3H -тимидина на ячейку. Клетки инкубировали с меченым тимидином в течение 18 ч и определяли его содержание с помощью жидкого сцинтилляционного счетчика. Все данные сравнивали с полученными для клеток, инкубированных только в среде, которые принимали за 100%.

Приготовление ядерных экстрактов и метод электрофоретической задержки подвижности в геле (EMSA). Ядерные белки выделяли как описано ранее [1]. Двухцепочечный олигонуклеотид E2F1 и Мус-Мас-олигонуклеотид метили на концевых участках с помощью γ - ^{32}P -АТФ, используя T_4 -полинуклеотидкиназу. Протокол EMSA использован как описано ранее [12]. Все задержки подвижности в геле пробы были воспроизведены не менее 3 раз.

Имплантация *in vivo* клеток культивируемой линии С6. 20 самцам крыс линии Вистар массой 200–250 г были имплантированы клетки глиомы С6 в объеме 2 мкл. Имплантацию осуществляли под операционным микроскопом. Крыс анестезировали внутривенной инъекцией кетамина (40 мг/кг) и ксилазина (8 мг/кг). На коже головы делали разрез над лобно-теменной областью длиной 10 мм, на 2 мм латеральнее сагиттального шва и параллельно ему. Через костное окно 4×1 мм рассекали твердую оболочку мозга в ретролатеральной части трепанационного отверстия и параллельно коронарному шву. Имплантацию проводили с помощью стеклянной пипетки (наружный диаметр — 1 мм, внутренний — 0,8 мм), подсоединенной под углом 45° на 4 мм проксимальнее кончика пипетки к насосу. До имплантации проводили инъекцию 1 мл изотонического раствора субдурально через костное отверстие, при этом пипетку вводили на 4 мм каудально и выше поверхности мозга для отслаивания твердой мозговой оболочки. Используя ту же пипетку, отсасывали 1 мкл коркового вещества. Кровотечение останавливали с помощью гемостатической губки. 2 мкл суспензии, содержащей 1×10^6 клеток глиомы С6, инъецировали через пипетку в подготовленное пространство. Место трепанации обрабатывали гемостатической губкой. Крысы были под наблюдением в течение 10 сут после имплантации. Гистологическое исследование выполнено общепринятыми методами. Срезы окрашивали гематоксилином—эозином.

Результаты исследования. Включение ^3H -тимидина в клетки глиомы С6. Интенсивность включения меченого тимидина как маркера синтеза клеточной ДНК значительно снижалась до 46,5% после воздействия PD98059 и до 40% и 28% — при обработке Go6976 и Go6983 соответственно, в то время как эндотелин-1 увеличивал включение меченого тимидина до 67% после 18-часовой обработки (рис. 1).

Изменения E2F и Мус-Мас-активности связывания. Ядерные экстракты клеток глиомы С6, обработанных эндотелином-1 или PD98059, использовали для определения E2F- или Мус-сайт-специфических ДНК-связанных белков с помощью EMSA-анализа. Установлено существенное увеличение уровня активности как E2F-, так и Мус-ДНК-связывания после обработки эндотелином-1 в течение 18 ч (рис. 2).

Ингибитор ERK PD9805 снижал активность E2F и Мус ДНК-связывания и индуцированную эндотелином-1 активность E2F и Мус. Эти результаты показывают, что эндотелин-1-индуцированная E2F- или Мус-регуляция связана ERK.

Морфологическая оценка. Успешная кортикально-арахноидальная имплантация и развитие опухоли во фронтальной зоне выявлены у всех экспериментальных животных. Через 10 сут после имплантации опухоли имели сферическую форму и внедрялись в ткань мозга.

В опытах *in vitro* клетки глиомы (рис. 2, а), обработанные эндотелином-1, активно пролиферировали (см. рис. 2, б), тогда как их обработка в течение 18 ч PD98059 приводила к значительным морфологическим изменениям, выражающимся в появлении более округлых клеток с длинными отростками (см. рис. 2, в). При морфологическом анализе имплантированных клеток глиомы С6, обработанных эндотелином-1, обнаружены начальная их инфильтрация в мозг и инвазивный рост опухоли. Значительно меньшие, чем в контроле, опухоли наблюдались у крыс после трансплантации клеток глиомы С6, обработанных в течение 18 ч PD 98059 (1 мкМ) (рис. 3).

Обсуждение полученных данных. Трансплантированные клетки глиомы С6, обработанные нейропептидами и ингибиторами MAPK, обнаруживают различное время выживания, а также слабую или отчетливо выраженную пролиферацию. Действие специфических ингибиторов или нейропептидов на способность опухолевых клеток выживать и пролиферировать может иметь важное значение.

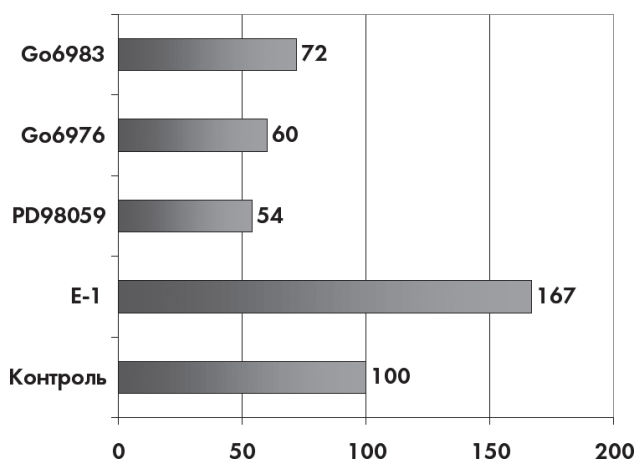


Рис. 1. Включение ^3H -тимидина в клетки глиомы С6. Эффекты эндотелина-1 (E-1), MEK-ингибитора PD 98059, ингибиторов протеинкиназ Go6976, Go6983.

По горизонтальной оси — доля включения ^3H -тимидина по сравнению с контролем, принятым за 100. Клетки инкубировали в среде DMEM +5% фосфатно-солевом буфере или с ингибитором или эндотелином-1 в течение 30 мин перед добавлением 4 мкCi/мл ^3H -тимидина и инкубировали в течение 18 ч.

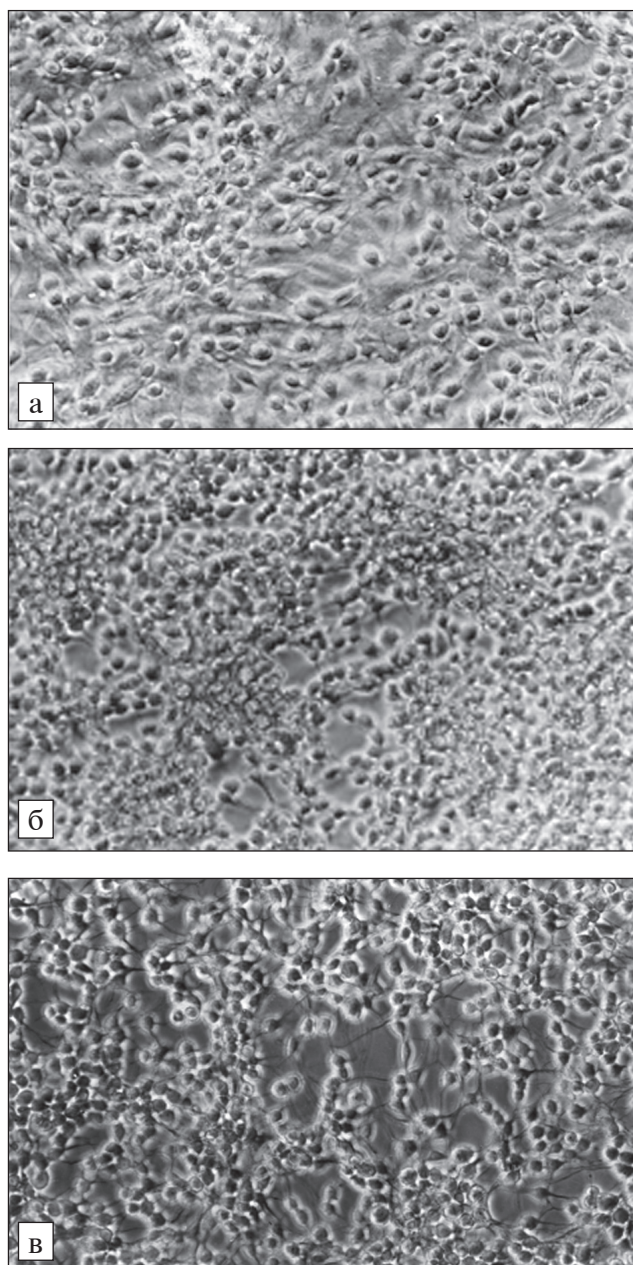


Рис. 2. Клетки глиомы С6.

а — контроль; б — усиленная пролиферация клеток после их обработки эндотелином-1 (50 нМ) в течение 18 ч; в — морфологические изменения клеток после 18 ч обработки PD98059. Прижизненная микроскопия. Фазовый контраст. Об. 10, ок. 10.

Наши данные показывают, что в условиях *in vitro* эндотелин-1-рецепторная регуляция и транскрипция могут эффективно стимулировать рост и инвазивность глиомы. Напротив, обработка трансплантируемых клеток глиомы С6 МЕК-ингибитором *in vitro* приводит к развитию отчетливо меньших по размерам опухолей, чем в контроле, что указывает на защитный эффект такой обработки. Используемая модель является экспериментально-лабораторной и дает возможность исследовать поведение *in vitro* культивируемых инвазивных клеток.

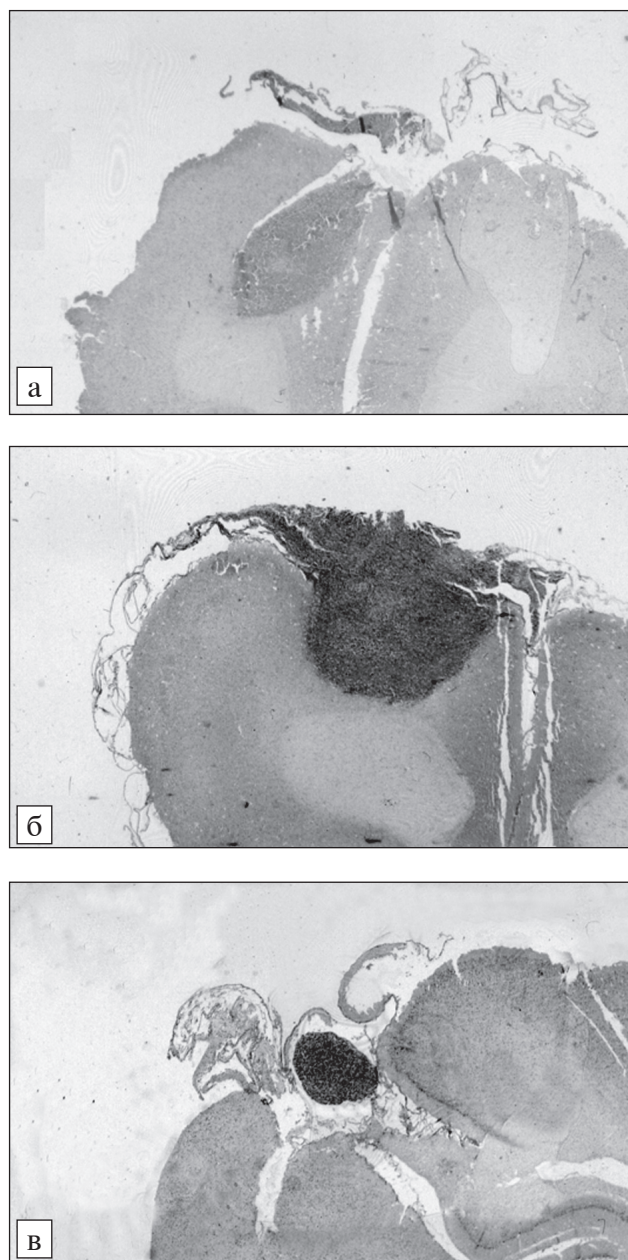


Рис. 3. Кортико-арахноидальная имплантация клеток глиомы С6 в правую фронтальную область мозга крысы.

а — срез мозга крысы с трансплантированными клетками на 10-е сутки при отсутствии их обработки (контроль); б — срез мозга крысы с трансплантированными клетками, обработанными *in vitro* эндотелином-1 (50 нМ) в течение 18 ч; в — срез мозга крысы на 10-е сутки после трансплантации клеток, обработанных PD98059 (1 мМ) в течение 18 ч. Окраска гематоксилином. Ув. 20.

ЛИТЕРАТУРА

1. Andrews N.C. and Faller D.V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting number of mammalian cells. *Nucl. Acids Res.*, 1991, v.19, p.24.
2. Barg J., Belcheva M.M., Levy R. et al. Opioids inhibit endothelin-mediated DNA synthesis, phosphoinositide turnover, and Ca^{2+} mobilization in rat C6 glioma cells. *J. Neurosci.*, 1994, v.14, p. 5858–5864.

3. Blumer K. and Johnson G. Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. Trends Biochem. Sci., 1994, v.19, p. 236–240.
4. Cane E. and Mahadevan L. Parallel signaling processing among mammalian MAPKS. Trends Biochem. Sci., 1995, v.20, p. 117–122.
5. Chang L. and Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. Nature, 2001, v.410, p. 37–40.
6. Couraud, P.-O., Durieu-Trautmann O., Nguyen D.L. et al. Functional endothelin-1 receptors in rat astrocytoma C6, Eur. J. Pharmacol., 1991, v.206, p. 191–198.
7. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. Genes Dev., 1998, v.12, p. 2245–2262.
8. Nevins J.R. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and Retinoblastoma families. Cell Growth Differ., 1998, v. 9, p. 585–593.
9. Nevins J.R. The Rb/E2F pathway and cancer. Hum. Mol. Genet., 2001, v.10, p. 699–703.
10. Saito A., Shiba R., Kimura S. et al. Vasoconstrictor responses of large cerebral arteries of cats to endothelin, an endothelium-derived vasoactive peptide. Eur. J. Pharmacol., 1989, v. 162, p. 353–358.
11. Stork P.J.S. and Schmitt J.M. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. Trends Cell Biol., 2002, v. 12, p. 258–266.

12. Tencheva Z.S., Belcheva M.M., Velichkova A.A. et al. Opioid regulation of AP-1 DNA binding activity in NG108-15 cells under conditions of opioid receptor adaptation. Mol. Brain Res., 1997, v.48, p. 156–158.

Поступила в редакцию 10.08.06
Получена после доработки 18.09.07

INTRACEREBRAL PROGRESSION OF TRANS-PLANTED RAT C6 GLIOBLASTOMA CELLS PRETREATED WITH NEUROPEPTIDES AND MAPK INHIBITOR

Z.S. Tencheva and I.R. Panov

The authors have monitored C6 glioma cell invasive growth, proliferation and transcriptional regulation after pretreatment with endothelin-1 and ERK1/2 specific inhibitor PD98059. To explore proliferation of C6 glioma cells in different growth conditions, they were treated in vitro with endothelin-1 and implanted into the brain. In vitro studies have indicated that PD98059 inhibited the proliferation of cultured C6 glioma cells and induced the activation of E2F1 and Myc-Max transcriptional factors. Endothelin-1 strongly increased C6 glioma cell proliferation. The model used in this study is experimental, but it may provide an insight into the specific behavior of in vitro cultured invasive cells.

Key words: glioma cells, proliferation, transplantation.

Institute of Physiology, Bulgarian Academy of Sciences, University Hospital Losenetz, Sofia, Bulgaria

© Коллектив авторов, 2007
УДК 591.48

Р.Ш. Штанчаев¹, Г.З. Михайлова¹, Н.Ю. Дектярева², Н.А. Коканова² и Д.А. Мошков^{1,2}

ИЗМЕНЕНИЯ ВЕНТРАЛЬНОГО ДЕНДРИТА МАУТНЕРОВСКОГО НЕЙРОНА ЗОЛОТОЙ РЫБКИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ОПТОКИНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

¹ Лаборатория ультраструктуры нейрона (зав. — проф. Д.А. Мошков) Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пушкино; ² магистерская образовательная программа «Медико-биологические науки» (зав. — проф. Э.И. Лежнев) Учебного центра биофизики и биомедицины Пушкинского государственного университета

Недавно установлено, что следование за оптомоторным барабаном, вращающимся контралатерально относительно спонтанно предпочитаемой мальками золотых рыбок стороны поворота, инвертирует их моторную асимметрию. Изучение структуры мautнеровских нейронов (МН) с помощью гистологической техники трехмерной реконструкции и измерение объемов правого и левого МН таких рыбок выявило у ипсилатерального МН трехкратное уменьшение объема вентрального дендрита (ВД), находящегося в реципрокных отношениях с функциональной активностью МН. При этом суммарный объем контралатерального МН оставался на четверть больше объема ипсилатерального, как это свойственно для интактных рыбок. Предполагается, что уменьшение размера ВД, получающего афферентацию от контралатерального глаза, который следит за движущимися полосами оптомоторного барабана, является результатом специфической контралатеральной зрительной стимуляции и первым свидетельством возможности естественной стимуляции МН через ВД.

Ключевые слова: мautнеровские нейроны, размеры, специфическая зрительная стимуляция, морфофункциональная асимметрия.

Изучение взаимосвязи между структурой (размером) и функциональной активностью нейронов способствует расшифровке молекулярных механизмов адаптации и памяти [11]. Использование для этого в качестве объекта парных, зеркально

расположенных в продолговатом мозгу золотой рыбки гигантских мautнеровских нейронов (МН), оказалось весьма перспективным. Проявление их функциональной активности в поведении просто контролировать [1, 5, 6, 8]. Каждый из МН