

УДК 612.823

А.И.Анискина (4 курс ФМедФ СПбГПУ),
Б.В.Крылов, д.б.н., проф. ИФ РАН

ВЛИЯНИЕ ОУАБАИНА НА РОСТ НЕЙРИТОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

Использование метода культуры ткани позволяет исследовать физиологически активные вещества, исключая действующие в целостном организме гуморальные, нервные и другие влияния. Классическая органотипическая культура спинномозговых ганглиев 10-11 дневных эмбрионов позволяет определить направленность влияния исследуемого вещества на рост нейритов.

Целью этой работы было исследование действия оуабаина, селективного ингибитора $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ азы, примененного в различных концентрациях, на рост нейритов чувствительных нейронов.

Эксперименты были проведены в органотипической культуре на эксплантатах спинномозговых ганглиев 10-11 дневных куриных эмбрионов, культивируемых в течение 3 суток в чашках Петри при $36,5 \text{ C}^\circ$ на покровных стеклах с подложками из коллагена. Исследуемое вещество добавляли в питательную среду. В качестве контроля использовали эксплантаты, культивируемые только в условиях питательной среды. Рост нервных элементов в культуре ткани контролировали на витальных препаратах с помощью фазово-контрастного микроскопа, а также на гистологических препаратах, окрашенных метиленовым синим. Селективный ингибитор $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ азы – оуабаин – был исследован в концентрациях $1 \cdot 10^{-12} \dots 1 \cdot 10^{-4}$ М.

Через 3 суток культивирования в контрольных эксплантатах формируются две отчетливо выраженные зоны: центральная, состоящая из немигрирующих дифференцирующихся нейробластов, и периферическая, представляющая собой характерный ореол вокруг ганглия, образуемая растущими нейритами, фибробластоподобными клетками и глией. За время культивирования становятся явными различия в развитии культур с добавлением в питательную среду исследуемого агента и в контрольных экспериментах. У контрольных эксплантатов наблюдалась интенсивная зона роста, тогда как у эксплантатов, подвергшихся действию оуабаина в высоких концентрациях, она отсутствовала.

Индекс площади (ИП) рассчитывали в относительных единицах как соотношение площади всего эксплантата с зоной роста из нейритов к исходной площади самого ганглия. Контрольное значение ИП принимали за 1.

При добавлении оуабаина в концентрации $1 \cdot 10^{-12}$ М не наблюдалось его влияния на рост нейритов, и ИП экспериментальных ганглиев не отличался от ИП в контроле. При введении оуабаина в концентрациях $5 \cdot 10^{-12}$, $1 \cdot 10^{-11}$, $5 \cdot 10^{-11}$ М, наблюдалось некоторое статистически недостоверное угнетение роста нейритов, тогда как при концентрации оуабаина $1 \cdot 10^{-10}$ М наблюдалось 50% достоверное снижение роста нейритов по сравнению с контролем. Добавление исследуемого агента в более высоких концентрациях выявило статистически достоверный ингибирующий эффект. При концентрациях оуабаина в диапазоне от $1 \cdot 10^{-9}$ М до $1 \cdot 10^{-4}$ М рост нейритов практически отсутствовал, т.е. ИП эксплантатов составлял 1.

Аппроксимация зависимости ИП от концентрации оуабаина с помощью уравнения Хилла

$$\text{ИП} = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{K_d}{[Ou]} \right)^H},$$

где H -коэффициент Хилла, K_d -концентрация оубаина, вызывающая 50% снижение величины исследуемой функции, позволила установить, что величина K_d составила $1 \cdot 10^{-10}$ М, а H был равен 1.

Анализируя полученные данные, отметим в первую очередь высокую чувствительность к оубаину, селективному ингибитору $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФазы}$, исследуемых эксплантатов. Это говорит о том, что натриевый насос выполняет ряд пока не изученных физиологических функций, одной из которых является участие в регуляции роста нейритов. $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФаза}$ является важнейшим регулятором, поддерживающим постоянство концентраций Na^+ и K^+ внутри клетки. Эта макромолекула представляет собой димер, состоящий из α - и β - субъединиц. Известны 4 изоформы α -субъединицы и 3 изоформы β -субъединицы. α -изоформы различаются по своей чувствительности к ионам Na^+ и K^+ , к физиологическим стимулам и гормонам, а также к оубаину. Было показано, что наименьшей чувствительностью к оубаину обладает $\alpha 1$ -изоформа.

Известно, что «выключение» $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФазы}$ как молекулярной системы активного транспорта в диссоциированной культуре чувствительных нейронов спинномозговых ганглиев крыс происходит при относительно высоких концентрациях оубаина, превышающих $2 \cdot 10^{-4}$ М. Тот факт, что на несколько порядков более низкие концентрации этого агента полностью ингибировали рост нейритов в органотипической культуре чувствительных нейронов, свидетельствует о том, что $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФаза}$, пока неизвестным образом участвует и в регуляции роста нейритов. $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФаза}$, видимо, является важным молекулярным звеном при передаче сигналов от опиоидных рецепторов к медленным натриевым каналам (Крылов Б.В. и др., 1999). Все это свидетельствует о том, что $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФаза}$ является важнейшей молекулярной структурой, выполняющей не только свою хорошо известную функцию поддержания на постоянном уровне мембранного потенциала клетки. При введении селективного ингибитора $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{АТФазы}$ в концентрациях выше $1 \cdot 10^{-9}$ М происходит нарушение роста нервных окончаний чувствительных нейронов. Таким образом, нормальное функционирование натриевого насоса играет важную роль в регуляции роста нейритов.