



УДК 591.481.1 + 612.8

ОСОБЕННОСТИ ПОЛИПЕПТИДНОГО СОСТАВА ФУНКЦИОНАЛЬНО РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

ВЕРЕТЕННИКОВ Н. А.

Институт мозга ВНИЦ психического здоровья АМН СССР, Москва

Данное исследование направлено на идентификацию полипептидов, свойственных каждому из трех различающихся в функциональном отношении образований мозга крысы—гигантоклеточного ретикулярного ядра продолговатого мозга (ГЯ), пирамидного слоя CA_3 - CA_4 полей гиппокампа (СА) и сенсорного образования—наружного коленчатого тела (НКТ). При использовании собственной модификации микроэлектрофореза на плоских ПААГ показано наличие полипептидов, характерных для каждого из указанных образований. Найдено, что эти полипептиды локализуются в основном в низкомолекулярной области спектра.

В настоящее время существуют данные о наличии белков, специфических для нервной ткани (мозгоспецифические белки типа S-100), для отдельных образований мозга млекопитающих [1—4], идентифицированных нейронов беспозвоночных животных [5, 6]. В последнее время получены сведения о наличии уникальных белков нейронов некоторых образований мозга млекопитающих на основе использования иммунологических методов [7—9].

Учитывая сказанное о наличии уникальных белков в нейронах, логично предположить возможность выявления специфических полипептидов в образованиях, различающихся в морфофункциональном отношении: сенсорного (НКТ), одного из ядер ретикулярной формации—гигантоклеточного продолговатого мозга и ассоциативного (СА).

Материалы и методы

Экстракцию полипептидов из ткани образований мозга производили у 40 взрослых крыс линии *Wistar* с помощью ДДС-На и 2-меркаптоэтанола [10]. Для фракционирования образцов была разработана собственная модификация микроэлектрофореза в присутствии ДДС-На на плоских 15%-ных ПААГ толщиной 300 мкм, позволяющая одновременно анализировать 10 образцов, объемом 60 нл каждый с количеством белка в образце 10^{-10} г [10]. Денситограммы получали сканированием на двухволновом микроденситометре НИОХ СО АН СССР [11]. От-

носительные электрофоретические подвижности (R_f) рассчитывали как отношения миграционных расстояний каждой экстрагированной полипептидной фракции к таковому белка-свидетеля—цитохрома С. Оценку M_r экстрагированных из мозга полипептидных фракций осуществляли на основании калибровочных зависимостей логарифмов M_r белков-сви-

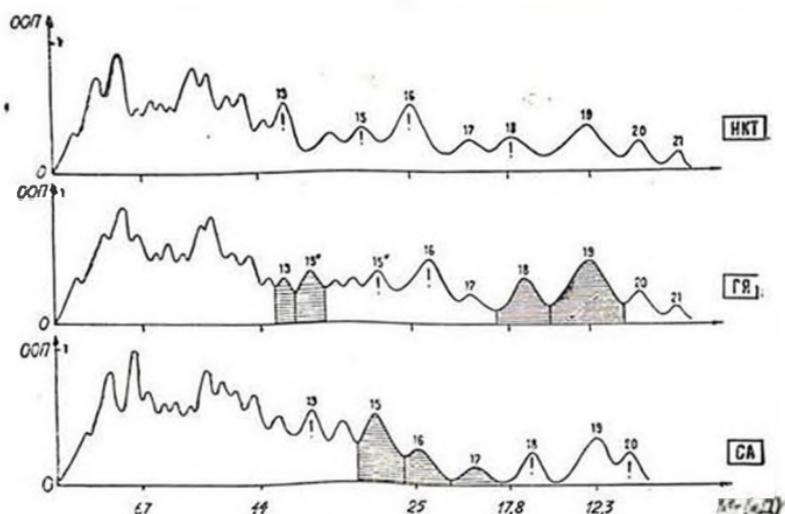


Рис. Денситограммы полипептидных спектров исследованных образований мозга крысы. ГЯ—гигантоклеточное ретикулярное ядро продолговатого мозга крысы, НКТ—наружное колеччатое тело, СА—пирамидный слой СА₂-СА₄ поля гиппокампа. (!)—фракции, содержащие полипептиды, в большей мере присущие каждому из исследованных образований; штриховкой обозначены фракции, различающиеся по относительному содержанию полипептидов в них у ГЯ, НКТ, СА. По оси абсцисс—значения M_r белков-свидетелей и направление миграции полипептидов (к аноду); по оси ординат—относительная оптическая плотность (ООП). Цифры над денситограммами обозначают номера фракций. Фракционирование на 15% ПААГ

детелей от их R_f [5]. Относительные концентрации полипептидов во фракциях определяли как отношения площади каждого пика, соответствующего данной фракции на денситограмме, к суммарной площади всей денситограммы [12]. Для исследования полипептидных спектров изучавшихся образований сравнивали R_f фракций, близких по значениям этого параметра (определяли качественные различия во фракциях). Фракции, найденные не различающимися по R_f , сопоставляли по относительному содержанию полипептидов в них (определяли количественные различия во фракциях). Статистическую обработку результатов осуществляли по t -критерию Стьюдента для $p \leq 0.05$.

Результаты и обсуждение

При фракционировании образцов определены 23 фракции полипептидов в ГЯ, 21—в НКТ и 20—в СА (рисунок, табл. 1, 2).

В основе действия ДДС-На и 2-меркаптоэтанола лежит денатурация белков на субъединицы с восстановлением их дисульфидных связей [13]. Для оценки величины M_r таких субъединиц строили калибровочные зависимости $\lg M_r$ белков-свидетелей от их R_f , имевшие линейный характер (табл. 3).

Таблица 1

Подвижности полипептидных фракций гигантоклеточного ретикулярного ядра продолговатого мозга (ГЯ), наружного колеччатого тела (НКТ) и пирамидного слоя CA_3 — CA_4 полых гиппокампа (СА) мозга крысы

№ пика	ГЯ (n=11)*	НКТ (n=30)	СА (n=24)
1	42±3,7	40±5	55±8
2	89±5,5	82±5,5	102±11,4
3	125±6,4	121±6,1	150±15,7
4	153±6,6	159±6,3	173±15,5
5	189±6,5	182±6,2	200±13,9
6	212±6,5	200±6,4	222±12,8
7	237±6,3	222±6,4	247±12,3
8	272±7	250±6,5	284±10,5
9	293±8,9	280±6,6	307±9,9
10	331±6,6	316±7,3	333±9,3
11	362±7	345±7,1	364±8,4
12	399±7,5	394±7	411±8,5
13**	429±7,5	444±7	471±7,7
13*	469±7,7	—	—
14	511±8	508±7,7	528±7,2
15	546±7,7	569±8,2	591±8
15***	595±7	—	—
16	695±8	671±6,5	680±7,4
17	782±6,6	769±7,6	777±6,2
18	883±4,4	871±6,9	893±6
19	1000±0	1000±0	1000±0
20	1087±4,2	1094±6,3	1071±6,9
21	1162±7,1	1184±11,3	—

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: *n—объем выборки; в столбиках указаны значения средних и ошибок средних; для получения истинных средних и ошибок сред них их значения следует поделить на 10^3 . **произошло сравнение подвижностей фракций № 13 ГЯ, НКТ, СА, а также № 13'' ГЯ, № 15 ГЯ, СА, НКТ и № 15'' ГЯ; относительные концентрации полипептидов в табл. 2 сравнивались подобным образом, $p \leq 0,05$ здесь и в табл. 2.

Специфичные для отдельных образований полипептиды найдены в низкомолекулярных фракциях. В СА это полипептиды из фракции № 20 с M_r 11,5 кД. В ГЯ и НКТ обнаружены полипептиды из двух фракций (№ 20 и 21), специфичные для обоих образований одновременно: с M_r 9,2—9,8 кД и с M_r 11—11,2 кД. В ГЯ и СА преобладают полипептиды с M_r 16,4 кД (фракция № 18) и с M_r 36,7—36,9 кД (№ 13 СА и № 13 ГЯ), не характерные для НКТ: а в ГЯ и НКТ—с M_r 17 кД (№ 18) и с M_r 38,9—39,8 кД (№ 13), не свойственные для СА. В СА и НКТ преобладают полипептиды с M_r 23,9 и 28,8 кД (№ 16, № 15), не характерные для ГЯ, а в СА и ГЯ—с M_r 23,9 и 28,8 кД (№ 16 СА и ГЯ, № 15'' ГЯ и № 15 СА), не свойственные НКТ.

Найден целый ряд фракций, различающихся в каждом из образований по относительному содержанию полипептидов в них и локализующихся также в низкомолекулярном диапазоне. Так, фракция № 19 (во всех образованиях с M_r 12,3 кД) в ГЯ в 1,7 раза достоверно больше таковых в СА и НКТ, не имеющих достоверных различий между собой. Фракция № 18 ГЯ (M_r 16,6 кД) достоверно превосходит по относительному содержанию полипептидов таковые НКТ и СА (№ 18)

Таблица 2

Относительные количества полипептидов во фракциях в гигантоклеточном ретикулярном ядре продолговатого мозга (ГЯ), наружном колеччатом теле (НКТ), пирамидном слое CA_3-CA_4 поля гиппокампа (СА) мозга крысы

№ пика	ГЯ (n=41)	НКТ (n=30)	СА (n=24)
1	30±3,8	39±5,3	42±7,1
2	61±4,7	82±6	98±7,4
3	71±3,9	103±6,4	94±6
4	62±5,5	37±2,5	65±7,9
5	34±2,2	16±2,7	37±3
6	46±2,9	40±2,9	49±4,2
7	36±1,8	35±1,9	44±4,5
8	61±3,4	69±5,7	73±7,7
9	61±4,2	67±4,7	55±4,1
10	43±2,5	55±2,7	44±3,8
11	54±2,7	60±3,9	63±5,4
12	26±1,8	38±2,6	45±2,6
13	24±1,3	51±2,1	56±3,9
14	40±1,9	33±1,8	41±3
15	21±1,1	47±1,7	58±4,3
16	24±1,5	83±3	37±3,3
17	40±2,1	30±1,8	19±2,1
18	71±3,1	40±2,2	31±3
19	27±1,6	54±3,2	50±5,2
20	47±2,7	30±2,1	30±5,5
21	90±4,1	18±1,7	—
22	32±2,1	—	—
23	17±1,8	—	—

Таблица 3

Подвижности белков-свидетелей, (n=29)

Название белка	Среднее	Ошибка среднего	M_r (кД)
Бычий сывороточный альбумин	160	10	67
Овальбумин	380	10	41
Химотрипсиноген	670	10	25
Миоглобин	850	0	17,8
Цитохром С	1000	0	12,3

более чем в 1,2 раза. Фракции № 16 (M_r 24,3 кД) и № 17 (M_r 20,3 кД) СА достоверно уменьшаются по этому же параметру от фракций № 16 и 17 ГЯ и НКТ более чем в 1,5 раза. Фракция же № 15 СА (M_r 28,3 кД) достоверно превосходит соответствующие ей фракции № 15 НКТ и № 15'' ГЯ более чем в 1,2 раза. И, наконец, фракции

№ 13 СА и № 13 НКТ преобладают над соответствующими им фракциями ГЯ (№ 13 и № 13'') более чем в 1,4 раза.

В литературе имеются сведения о специфических полипептидах, локализующихся в основном в области высокоподвижных белков, выделенных из следующих образований мозга млекопитающих: слуховых ядер, оливарного комплекса, нижнего двухолмия, внутреннего коленчатого тела, слуховой коры мозга [2], эпифиза, переднего гипоталамуса, скорлупы, серого и белого вещества коры мозга [1], зрительной, моторной и сенсорной коры мозга [3], верхнего и нижнего двухолмия, гиппокампа, продолговатого мозга, моста, мозжечка, гипофиза и зрительного нерва [4]. В исследованных нами трех образованиях мозга выявлена подобная специфика также в области высокоподвижных белков.

В состав изучавшихся образований входят различающиеся в морфофункциональном отношении классы нейронов: гигантские мультиполярные—в ГЯ, пирамидные—в СА, кустовидные—в НКТ [14, 15]. Возможно, эти классы нейронов, являющиеся основными клетками этих образований, определяют функциональную специфику указанных образований и вносят весомый вклад в химическую специфику ГЯ, СА и НКТ.

Автор благодарит профессора М. Б. Штарка и к. б. н. Н. И. Миничура за помощь при выполнении данной работы.

PECULIARITIES OF THE POLYPEPTIDE COMPOSITION OF THE FUNCTIONALLY DIFFERENT RAT BRAIN REGIONS

VERETENNIKOV N. A.

Brain Research Institute of the All-Union Research Centre of Mental
Health, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The present study was aimed to identify specific polypeptides in three functionally different formations of rat brain—n. reticularis gigantocellularis, pyramidal layer of the CA₃—CA₄ fields of hippocampus and corpus geniculatus lateralis. Polypeptides specific for the areas investigated have been found by means of SDS slab gel microelectrophoresis (our own modification). These polypeptides belong to the low molecular weight range of the polypeptide spectra.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pun J. U., Lombroso L. *Anal. Biochem.*, v. 9, № 1, p. 9—20, 1964.
2. D'Monte, Talwar G. P. *J. Neurochem.*, v. 14, № 7, p. 742—753, 1967.
3. Davies W. E. *J. Neurochem.*, v. 17, № 2, p. 297—303, 1970.
4. Ansorg R., Dames W., Neuhoff V. *Arzneimittel-Forsch.* Bd. 21, № 5, p. 699—710, 1971.
5. Gainer H. *Anal. Biochem.*, v. 44, № 2, p. 589—605, 1971.
6. Wilson D. L. *J. Gen. Physiol.*, v. 57, № 1, p. 26—40, 1971.

7. Schlichter D. J., Detre J. A., Asward D. W., Chehraz B., Greengard P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA Biol. Sci., v. 77, № 9, p. 5337—5541, 1980.
8. De Camilly P., Miller P. E., Levitt P., Walter U. Neuroscience, v. 11, № 4, p. 761—817, 1984.
9. Yamakuni T., Usui H., Iwanaga T., Kondō H., Odani S., Takahashi Y. Neurosci. Lett., v. 45, № 3, p. 235—240, 1984.
10. Веретенников Н. А., Микичур Н. И.—В сб.: Новые методы для медицинской практики и медико-биологических исследований (под ред. Ю. П. Никитца), с. 75—79. Новосибирск, ред.-изд. отдел СО АМН СССР, 1983.
11. Любославский В. А., Микичур Н. И.—В сб.: Новые методы научных исследований в клинической и экспериментальной медицине, с. 59—62. Новосибирск, ред.-изд. отдел СО АМН СССР, 1980.
12. Дерий Л. В. Нейрохимическое исследование физиологических состояний зимнеящих млекопитающих. Автореферат канд. дис., М., 1984.
13. Остерман А. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М., Наука, 1981.
14. Виноградова О. С. Гиппокам и память, М., Наука, 1975.
15. Леонтович Т. А. Нейронная организация подкорковых образований переднего мозга, М., Медицина, 1978.

Поступила 15. I 1987

Принцип Дейла и межнейронная коммуникация. Труды коллоквиума Биохимического общества. Оксфорд, июль 1982 г. (Ред. Н. Н. Осборн) 212 с. 1983, (Англия).

Dalés Principle and Communication Between Neurons Proceedings of a Colloquium of the Biochemical Society. Held at the University of Oxford, July, 1982 (ed. N. N. Osborne), Pergamon Press, Oxford, GB, 1983, 212 p.

Книга состоит из вступительного раздела, написанного V. P. Whittaker, и девяти разделов по различным аспектам химических коммуникативных процессов между нейронами. Каждая из этих статей включает доклады признанных авторов, прочитанные на коллоквиуме, и их обсуждение. Последний раздел включает дополнительный материал, представленный д-рами I. M. Varndell и J. M. Polak, об использовании техники иммуниного прокрашивания золотом для выявления локализации трансмиттероподобных молекул на электронно-микроскопическом уровне. Предназначена для специалистов в области нейронаук.