



УДК 612.831.001.6:616.45—001.1/3

ВЛИЯНИЕ АГРЕССИВНОЙ РЕАКЦИИ НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ СПЕКТР КИСЛЫХ БЕЛКОВ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

КАРКИЩЕНКО Н. И., КУЛИКОВА О. Н., СТРАДОМСКИЙ Б. В.

Ростовский ордена Дружбы народов медицинский институт

Методом диск-электрофореза в 20%-ном ПААГ было проведено аналитическое разделение элюатов водорастворимых и тритон X-100 растворимых белков БТС-преальбуминовой фракции. Обнаружено, что в изученных структурах головного мозга количество зон водорастворимых белков БТС-преальбумина варьировало от 5 до 11. Наибольшей гетерогенностью крайне кислых белков отличался гипоталамус. Белковые зоны с электрофоретической подвижностью 0,50 и 0,56 с помощью поверхностной иммунопреципитации были идентифицированы как содержащие белок S-100.

Экстракция белков тритоном X-100 приводила к исчезновению белковых зон, расположенных в катодной части электрофоретического спектра.

Агрессивная реакция крыс сопровождалась значительным увеличением количества белка в зонах кислых белков исследованных структур головного мозга, включая содержащие белок S-100. В неокортексе и гиппокампе в катодной части электрофоретического спектра обнаружено появление дополнительной белковой зоны с R_m 0,03, отсутствовавшей у контрольных животных (интактных и подвергнутых электрокожным раздражениям).

В последнее время появилось немало работ, посвященных изучению молекулярных механизмов эмоционального стресса. Такие исследования продиктованы необходимостью изыскания оптимальных средств лечения психических заболеваний [1—6].

Важнейшим звеном в процессах, обеспечивающих механизмы интегративной деятельности головного мозга, являются биологически активные низкомолекулярные белки. К подобным белкам относятся преальбумины мозга, в частности белок S-100, выполняющий важную функцию в реализации нервных процессов [7—10].

В связи с тем, что в настоящее время отсутствуют исследования, посвященные изучению участия биологически активных белков в механизмах развития эмоциональных стрессов, целью данной работы явилось исследование кислых низкомолекулярных белков различных структур головного мозга крыс при реакции агрессии—одной из форм эмоционального стресса.

Материалы и методы

Опыты проводили на 100 нелинейных белых крысах-самцах массой 220—250 г. Основную контрольную группу составляли интактные животные, находящиеся в условиях вивария. В качестве модели агрессивного поведения использовали агрессию, вызываемую электрокожным раздражением [11, 12]. Для этого крыс помещали парами в специальную камеру с электродным полом. Животных в камере подвергали 6-кратной электростимуляции в течение 1 ч электрическими импульсами частотой 100 имп/сек, напряжением 15—20 В, силой тока 1,5—2,0 мА. По окончании электростимуляции крыс декапитировали и на холоду извлекали головной мозг.

Для контроля влияния самих электрокожных раздражений на белковый метаболизм при изучении агрессивного поведения была исследована группа крыс, каждую из которых отдельно помещали в камеру и подвергали электростимуляции при тех же параметрах, что и у пары животных при вызове агрессивного поведения.

У половины групп животных экстрагировали водорастворимые белки дистиллированной водой. У другой половины экстракцию проводили, используя 1%-ный раствор неионогенного детергента тритона X-100. Водорастворимые белки и белки, растворимые в тритоне X-100, экстрагировали из следующих структур головного мозга: неокортекса, гиппокампа, гипоталамуса, мозжечка, продолговатого и среднего мозга. Водорастворимые белки исследуемых структур контрольных и подопытных животных подвергали диск-электрофорезу в 7,5%-ном ПААГ в 1-ой щелочной системе [13]. Фракцию белков, движущуюся вместе с фронтом желтого пигмента, в области миграции свидетеля бромтимолового синего (БТС) к аноду— R_m 1,0—БТС-преальбумин—после проведения электрофореза вырезали из гелевых столбиков и элюировали в дистиллированной воде в течение 48 ч. Белки, экстрагированные 1%-ным раствором тритона X-100, разделяли с помощью диск-электрофореза в той же щелочной системе, что и водорастворимые белки, но для более надежного разделения белковых полос с добавлением в концентрирующую и разделяющую системы тритона X-100 до концентрации 0,1% [14]. Элюцию белков БТС-преальбумина вели в 1%-ном растворе тритона X-100 в течение 48 ч. Элюаты белков БТС-преальбумина каждого из отделов головного мозга разгоняли в 20%-ном ПААГ с рН 9,5. Для разделения детергентрастворимых белковых компонентов БТС-преальбумина в концентрирующую и разделяющую системы добавляли тритон X-100 до концентрации 0,1%. Одновременно проверяли гомогенность белка БТС-преальбумина путем повторного диск-электрофореза в 7,5%-ном ПААГ.

Идентификация белка S-100 в диск-электроферетическом спектре водорастворимых белков и белков, растворимых в тритоне X-100, была проведена с помощью поверхностной иммуопреципитации. Для этого столбики геля погружали на 48 ч в антисыворотку к нейроспецифическому белку S-100. На поверхности геля через 48 ч наблюдали линии precipitation в местах локализации белка S-100.

Окрашенные гели сканировали на денситометре «Spexol» (ГДР). Денситограммы разбивали на области, соответствующие определенным белковым зонам и по площади пиков судили о количестве белка в этих зонах. Площадь пиков рассчитывали по формуле: $J = k \cdot a \cdot c$, где J —площадь пика, k —коэффициент гауссовской кривой 1,067, a —высота пика, c —ширина пика на половине его высоты.

Общее количество белка определяли как сумму площадей отдельных пиков. Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

БТС-преальбуминовая фракция, куда входят низкомолекулярные биологически активные белки [15, 16], отличается высокой гетерогенностью. При разделении водорастворимых кислых низкомолекулярных белков в 20%-ном ПААГ нами было обнаружено, что различные струк-

туры головного мозга крыс содержат свой, индивидуальный набор этих белков. Наибольшей гетерогенностью кислых белков отличался гипоталамус. У контрольных животных в гипоталамусе наблюдалось до 11 фракций, что, возможно, связано с нейрогуморальной функцией этой структуры головного мозга. В других исследованных отделах мозга контрольных животных количество белковых зон варьировало от 5 до 9.

Зона с R_m 0,56 в неокортексе, продолговатом мозгу, мозжечке, среднем мозгу и гипоталамусе, а также зона с R_m 0,45 в мозжечке были представлены двойными полосами. У интактных животных зоны с R_m 0,75, 0,50 и 0,20 присутствовали во всех исследованных отделах мозга, а белковая зона с R_m 1,0—в следовых количествах. Белки, входящие в зону, расположенную сразу же за свидетелем, в наших экспериментах могли менять свою электрофоретическую подвижность в пределах от 0,73 до 0,80. Белковые зоны с электрофоретической подвижностью 0,50 и 0,56 с помощью поверхностной иммуопреципитации нами были идентифицированы как содержащие белок S-100. Белковые зоны с R_m 0,41 присутствовали в неокортексе, среднем мозгу и гипоталамусе. Зона с R_m 0,23 встречалась только в неокортексе и гипоталамусе, а белковые зоны с R_m 0,27 и 0,10 обнаружены в мозжечке и гипоталамусе. Далее было отмечено, что в среднем мозгу и гипоталамусе контрольных животных отсутствовала зона с R_m 0,45, в гиппокампе—белковые зоны с R_m 0,45 и 0,03, а в неокортексе—зона с R_m 0,03.

Реакция агрессии сопровождалась резкими количественными изменениями во фракциях кислых низкомолекулярных белков (табл. 1). В неокортексе наблюдали увеличение количества белка в зонах с R_m 0,23 и 0,20 на 104 и 937% соответственно по сравнению с контролем. Повышение количества белка в зонах, расположенных в катодной части спектра отмечено также в гиппокампе и гипоталамусе. Так, в гиппокампе увеличение количества белка было характерно для зоны с R_m 0,20 на 141%, а в гипоталамусе—для зон с R_m 0,23, 0,10 и 0,03, в которых прирост белка по сравнению с контрольными величинами достигал 28—81%. В этих структурах головного мозга мы наблюдали также возрастание количества суммарных кислых белков, входящих в 20%-ный ПААГ, на 13—41%, следовательно, неокортекс, гиппокамп и гипоталамус характеризуются однонаправленным типом реагирования на реакцию агрессии. Однако для неокортекса характерен и специфический ответ на агрессию, что выражается в уменьшении количества белка в зонах с R_m 0,54—0,56 и 0,45 на 26 и 21% соответственно по сравнению с контролем. В отличие от высших структур головного мозга в мозжечке агрессивная реакция вела к снижению количества белка в зонах, расположенных в катодной части электрофоретического спектра, на 36—52% по сравнению с контрольными величинами.

Были установлены не только количественные, но и качественные изменения во фракциях крайне кислых белков при агрессии. В неокортексе и гиппокампе в катодной части электрофоретического спектра

Таблица 1.

Содержание водорастворимых крайне кислых белков головного мозга крыс в зонах
20%-ного ПААГ

Структура		0,75	0,56	0,50	0,45	0,41	0,35	0,29	0,23	0,20	0,17	0,10	0,03	общая площадь денситограммы
Неокортекс	контроль	80±6	111±2	378±10	86±6	69±7	72±10	—	25±5	8±1	—	—	—	829±28
	опыт	79±12	83±8**	322±18	68±4**	67±3	80±9	—	51±3**	83±4**	—	—	102±5	933±17**
Гиппокамп	контроль	49±11	55±6	300±20	88±6	—	—	—	—	41±2	—	—	—	499±48
	опыт	42±2	51±5	300±9	83±5	—	—	—	—	106±14**	—	144±13	120±10	705±34**
Гипоталамус	контроль	80±2	249±22	394±23	—	170±16	153±10	179±12	57±2	270±28	121±11	185±17*	213±8	1999±91
	опыт	69±7	230±20	405±17	175±9	—	168±14	197±19	103±13**	311±20	94±12	—	297±18**	2265±44*
Средний мозг	контроль	48±6	84±10	398±17	—	99±7	144±7	—	—	117±1	—	—	145±12	1036±39
	опыт	38±8	86±7	415±25	—	138±12**	140±25	—	—	97±19	—	—	148±20	1060±88
Продолговатый мозг	контроль	117±15	115±14	330±20	124±11	—	128±14	—	—	121±12	—	—	39±5	974±74
	опыт	123±24	106±7	319±17	119±11	—	128±13	—	—	103±16	—	—	34±4	906±67
Мозжечок	контроль	76±10	136±12	397±23	128±14	—	108±10	—	—	179±16	92±13	111±11	138±7	1362±93
	опыт	86±15	146±4	415±10	143±6	—	120±12	—	—	86±8**	81±7	73±1**	80±10**	1230±40

Примечание. * $0,1 > p > 0,05$ ** $p < 0,05$

обнаружено появление дополнительной белковой зоны с R_m 0,03, отсутствовавшей у контрольных животных, а также у одиночных животных (без партнера), подвергнутых электростимуляции. При агрессивной реакции в гипоталамусе белки, находившиеся в зоне с R_m 0,41, изменяли свою подвижность в электрическом поле. R_m этих белков становилась равной 0,45.

Было показано, что экстракция белков с помощью 1%-ного раствора тритона X-100 приводила к исчезновению белковых зон, расположенных в катодной части электрофоретического белкового спектра. Основываясь на том, что обработка тритоном X-100 снижает электрофоретическую подвижность большинства белков за счет связывания белками достаточно большого количества молекул тритона X-100, нами были проведены дополнительные исследования, которые показали, что, действительно, белки, медленно мигрировавшие в 20%-ном ПААГ и располагавшиеся в катодной части спектра, выходили при обработке тритоном X-100 из состава зоны БТС-преальбумина. В 7,5%-ном ПААГ они мигрировали с R_m 0,97—0,98 вместо 1,0. Однако не исключено, что обработка белков детергентом может вызывать и диссоциацию белковых комплексов. Обработка тритоном X-100 вела не только к исчезновению медленно мигрировавших белков, но и к сильному снижению количества быстро передвигающихся белков зоны с R_m 0,75.

Мы установили, что средний и продолговатый мозг содержат 7 белковых зон, растворимых в тритоне X-100 кислых низкомолекулярных белков, неокортекс и мозжечок—6 зон, гипоталамус—5, а гиппокамп—4 белковые зоны. Во всех отделах мозга зона с R_m 0,45 и зона с R_m 0,56, за исключением гиппокампа, были представлены в виде двойных полос. Белок в зоне с R 1,0 был обнаружен в следовых количествах в исследуемых структурах головного мозга.

Экстракция белков тритоном X-100 приводила к появлению белковых зон крайне кислых белков, отсутствовавших в диск-электрофоретическом спектре водорастворимых белков. Так, в продолговатом мозгу выявились зоны с R_m 0,67 и 0,41, в мозжечке— зона с R_m 0,41, а в среднем мозгу—белковая зона с электрофоретической подвижностью 0,67.

При реакции агрессии мы наблюдали увеличение количества белка как в отдельных белковых зонах кислых низкомолекулярных белков, так и общего их количества, экстрагированного детергентом из исследованных отделов мозга и входившего в 20%-ный ПААГ (табл. 2), по сравнению с контролем. В неокортексе и гипоталамусе увеличение уровня белка отмечено для зоны с R_m 0,50 до 57%, в мозжечке—в зонах с R_m 0,41, 0,56 и 0,75 на 23,15 и 20% соответственно, в гиппокампе—в белковой зоне с R_m 0,56 на 58%. В продолговатом мозгу наблюдали уменьшение количества общего белка, входившего в 20%-ный ПААГ, а также в зонах с R_m 0,75 и 0,56 на 27—46%. В среднем мозгу отличий от контрольных значений не обнаружено.

Таким образом, наши исследования показали, что агрессивная реакция у крыс приводила к стойким как количественным, так и качест-

Таблица 2

Содержание растворимых в тритоне X-100 крайне кислых белков головного мозга крыс в зонах 20%-ного ПААГ

Структура		0,75	0,67	0,56	0,50	0,45	0,41	0,35	Общая площадь денситограммы
Неокортекс	контроль	53±5	—	70±1	448±11	113±3	91±5	82±4	857±27
	опыт	54±5	—	63±5	703±17**	110±3	80±9	64±9	1073±23**
Гиппокамп	контроль	след	—	114±6	645±32	148±6	—	—	907±7
	опыт	след	—	171±19**	700±38	180±14	—	—	1055±15*
Гипоталамус	контроль	след	—	45±3	475±5	—	48±5	42±4	510±18
	опыт	след	—	56±7	519±21*	—	63±5	48±3	686±21**
Средний мозг	контроль	53±1	36±4	150±10	588±12	136±4	88±4	61±1	1112±26
	опыт	49±8	42±3	122±10	589±32	149±10	112±10	74±7	1137±38
Продолговатый мозг	контроль	110±17	73±8	254±23	621±23	140±6	79±2	93±5	1370±34
	опыт	60±4**	62±5	185±11**	633±32	134±8	88±9	89±10	1251±61*
Мозжечок	контроль	56±6	—	103±10	486±35	92±7	77±10	47±7	861±51
	опыт	71±3*	—	105±12	573±17*	104±10	99±3	57±6	1069±18**

Примечание. * 0.1 > p > 0.05; ** p < 0,05

венным изменениям во фракциях крайне кислых низкомолекулярных белков. В исследованных отделах головного мозга подопытных животных эти изменения носили разнонаправленный характер, что вероятней всего определяется функциональными особенностями соответствующих структур. При развитии агрессивной реакции следует отводить особую роль коре больших полушарий головного мозга, где обнаружено появление дополнительной белковой зоны. Уменьшение, а также исчезновение ряда белковых зон мы связываем как с выходом белков из ткани мозга в ликвор, так и с усилением протеолиза белков и образованием олигопептидных компонентов. Не исключено, однако, что уменьшение количества белков водорастворимой фракции при агрессивной реакции является следствием увеличения связывания их с мембранами нервной ткани. Так, если количество водорастворимых кислых белков в мозжечке при агрессии незначительно уменьшалось, то воздействие детергента тритона X-100 на клеточные мембраны ткани этой структуры приводило к статистически достоверному увеличению количества белка при агрессии.

Тем не менее, основным ответом крайне кислых белков на реакцию агрессии явилось повышение их количества в исследованных структурах головного мозга. Мы предполагаем, что этот процесс происходил за счет увеличения солиubilизации кислых белков и отщепления их от мембран. Особое внимание привлекает увеличение количества белка в зонах, содержавших белок S-100 (R_m 0,56 и 0,50), функция которого тесно связана с регуляцией проницаемости мембран для ионов [7, 9].

AGGRESSIVE REACTION EFFECT ON THE ELECTROPHORETIC PATTERN OF ACIDIC PROTEINS IN RAT BRAIN DIFFERENT STRUCTURES

KARKISHENKO N. N., KULIKOVA O. N., STRADOMSKY B. V.

Medical School, Rostov-on-Don

Analytical separation of eluates of water-soluble and Triton X-100-soluble proteins of BTB-prealbuminous fraction was carried out using electrophoresis in 20% PAG.

It was found that in rat brain structures studied the quantity of water-soluble BTB-prealbumin protein zones varied from 5 to 11. Hypothalamus showed the most evident heterogeneity of extremely acidic proteins. Using surface immunoprecipitation technique the protein zones with electrophoretic mobility 0,50—0,56 were identified as the ones containing S-100 protein. Extraction of proteins with Triton X-100 resulted in disappearance of protein zones in the catode part of electrophoretic spectrum.

The aggressive reaction in rats was followed by considerable increase in acidic protein zones including those containing S-100. An additional protein zone with R_m 0,03 absent in control animals appeared in neocortex and hippocampus in the catode part of electrophoretic spectrum.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Налбандян Р. М.—В сб.: Вопросы биохимии мозга, т. 7, с. 221—232, Ереван, 1972.
2. Анохина И. П. Нейрохимические механизмы психических заболеваний, М., Медицина, 1975.
3. Матлина Э. Ш., Бару А. М., Васильев В. Н.—В кн.: Физиология человека и животных. Физиология эмоций, с. 31—93, М., Наука, 15, 1975.
4. Демин Н. Н.—В кн.: Проблемы ВНД и нейрофизиологии, с. 176—186, Л., Наука, 1975.
5. Каркищенко Н. Н.—В кн.: Катехоламинергические нейроны, с. 75—85, М., Наука, 1979.
6. Зиле Р. К., Клуша В. Е. Проблемы эндокринологии, т. 25, № 6, с. 73—79, 1979.
7. Hyden H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 71, p. 2965—2968, 1974.
8. Mahalik S. P., Korenovsky A., Rapport M. M., J. Neurochem., v. 33, p. 751—762, 1979.
9. Старостина М. В., Свиридов С. М. Молекулярная биология, т. 12, с. 372—376, 1978.
10. Долгов О. Н., Полетаев А. Б., Шерстнев В. В. Успехи физиол. наук, т. 11, № 3, с. 47—63, 1980.
11. O'Kelly L. E., Steckle L. C. J. Psychobiology, v. 8, p. 125—131, 1939.
12. Ulrich R., Wolff P., Azrin N. Anim. Behav., v. 12, p. 14—15, 1964.
13. Маурер Г. Диск-электрофорез, М., Мир, 1971.
14. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М., Наука, 1981.
15. Синичкин А. А., Прокофьев В. Н., Шерстнев К. Б., Кучеренко Н. А. Укр. биохим. журн., т. 50, № 4, с. 429—431, 1978.
16. Синичкин А. А. Укр. биохим. журн., т. 53, № 3, с. 113—122, 1981.

Поступила 1. IV 1984