

УДК 547.964.4:591.481.1:57.083.3

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАРДИОАКТИВНОГО БЕЛОК-ГОРМОНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ГИПОТАЛАМУСА

СРАПИОНЯН Р. М., АБЕЛЯН Ж. Г., РОСТОМЯН М. А.,
ГАБРИЕЛЯН С. К., БОЧКО И. Ф.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Получена кроличья антисыворотка к кардиоактивному белок-гормональному комплексу (БГК), выделенному из бычьего гипоталамуса. Установлена методом иммуноэлектрофореза высокая специфичность указанной антисыворотки (процент перекрестных реакций с двумя другими кардиоактивными комплексами не превышает 0,1%).

Разработан метод радиоиммунологического анализа содержания БГК в экстрактах органов кошки, позволяющий обнаружить до 0,05 нг БГК в пробе. Используя реакцию связывания комплемента удалось установить специфичность кардиоактивного БНК для нервной ткани, в которой его содержание в 10^3 раз выше по сравнению с другими тканями. Содержание БНК-подобного иммунореактивного материала в висцеральных органах, за исключением печени, невелико (0,07—0,13 нг/г свежей ткани) и распределено относительно равномерно. На основании полученных данных допускается возможность как синтеза БГК-подобного соединения в различных органах, так и выброса гипоталамического БНК в общую циркуляцию.

Ранее нами из гипоталамусов крупного рогатого скота были изолированы и идентифицированы 4 кардиоактивных белок-гормональных комплекса [1]. Была установлена гликопротеиновая природа диссоциированных из комплекса высокомолекулярных компонентов и доказана гомологичность низкомолекулярных кардиоактивных соединений с ранее выделенными нейрогормонами «К», «С» и «Г» [12].

Был выяснен нековалентный, по-видимому, электростатический характер связывания гликопротеинов с кардиоактивными нейрогормонами и образование соответствующих белок-гормональных комплексов, условно обозначенных нами БНК, БНС и БНГ [3]. Изучение субклеточной локализации искомых белок-гормональных комплексов (БГК) установило их преимущественное содержание (примерно 70%) в синапсомной фракции и нейросекреторных гранулах (около 30%). В остальных исследуемых субфракциях—миелиновой, митохондриальной и ядерной—подобная коронарность не была обнаружена.

Учитывая, что с представлениями о специфичности, распределении и дифференциации этих БГК связано решение ряда вопросов, среди кото-

рых значительными являются иммунохимические подходы, особое внимание было уделено получению специфических к ним антисывороток. Выработанные кроличьи антисыворотки были высокоспецифичными [4]: процент перекрестных реакций между комплексами не превышал 0,1%. Выявляемая при этом единственная дуга преципитации свидетельствовала также об иммунохимической гомогенности используемых антигенов. Помимо сказанного, антисыворотки характеризовались достаточной чувствительностью и, как оказалось впоследствии в радиоиммунологических опытах по исследованию количественного содержания БНК-подобной иммунореактивности (ИР), позволяли определить до 50 пг в пробе [5]. В сравнительном аспекте было проведено также радиоиммунологическое исследование распределения и количественного содержания подобной иммунореактивности в мозгу и некоторых органах крысы, кошки и быка [6].

Целью настоящего исследования явилось радиоиммунологическое изучение содержания БНК-подобного материала в отделах головного мозга, а также различных органах кошки.

Материалы и методы

Электрофоретически гомогенный БНК был выделен и очищен из гипоталамусов крупного рогатого скота по схеме, описанной ранее [3]. Получение антисыворотки к БНК. Антисыворотку к БНК получали методом его многократной инъекции кроликам по следующей схеме. Первую инъекцию проводили подкожно в нескольких точках. Животные получали антиген в виде коллоидной смеси с адьювантом Фрейнда. Через 2 недели осуществляли второй цикл иммунизации—одноразовое введение антигена. Третий цикл (через 4 недели) включал в себя подкожное введение вещества в четырех точках и одну внутримышечную инъекцию. Спустя 1 месяц проводили четвертый цикл иммунизации—одноразовое введение антигена в одной точке. Реиммунизация была сделана в виде повторного одноразового внутривенного введения животному 1 мг БНК без адьюванта. Каждое животное в итоге получало 2 мг БНК. Кровь брали из ушной вены на 4, 7, 9, 14 и 20 дни иммунизации и через 7—10 дней после реиммунизации. Сыворотку крови лиофилизировали и хранили при -14° . Использовали ее без дальнейшей очистки. Специфичность антисыворотки проверяли методом двойной иммунодиффузии по Ouchterlony [7]. Аналитический иммуноэлектрофорез проводили по методу Грабара, Буртина [8].

Иодирование проводили с помощью хлорамина Т по методу Greenwood и соавт. [9] с некоторыми модификациями. Реакционная смесь содержала: 5 мкг БНК, растворенного в 10 мкл 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,5; 1 μ Ки [125 I] («Amersham», Англия), 50 мкг хлорамина Т, растворенного в 10 мкл того же буфера, через 40 с добавляли 120 мкг м-бисульфита натрия в 10 мкл 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,6 и 50 мкг йодистого калия в 20 мкл того же буфера. Иодированный продукт отделяли на колонке размерами 1×120 см с сефадексом G-25 и элюировали 0,005 М фосфатным буфером, содержащим 1%-ный БСА, со скоростью 0,5 мл/мин. Фракции, содержащие иодированный БНК, разводили веро-

наловым буфером № 1, рН 8,1 с составом (г/л): Na-бисульфит—10,3, NaCl—5, азид натрия—0,1, БСА—5, разливали по 0,2 мл и хранили при —20°. Эксперименты велись в пластиковых пробирках. В ходе опытов были применены процедуры, модифицированные Bolton, Hunter [10]. К 100 мкл немеченого антигена добавляли 100 мкл кроличьей антисыворотки к БНК в конечном разведении 1:10000 в буфере № 1. После инкубации при 4° в течение 24 ч добавляли 200 мкл йодированного белка, с меткой составляющей приблизительно 10000 имп., тщательно смешивая содержимое, и инкубировали 24 ч при 4°. Затем добавляли 150 мкл неиммунной кроличьей сыворотки, 100 мкл вторичных козьих антител и после 1 ч инкубации при 4° центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин. Радиоактивность препаратов БНК измеряли на сцинтилляционном счетчике SL-4221 («Intertechnique», Франция), рассчитывая величину, характеризующую связь между радиоактивностью и количеством связанного БНК.

Выделение и экстракция тканей. Кусочки различных органов кошки были взяты после тщательной перфузии. С этой целью у животного под уретановым наркозом вскрывали грудную клетку, вставляли канюлю в левый желудочек сердца. При помощи специальной системы под давлением вводили физиологический раствор (около 4,5 л) до тех пор, пока из надреза в области правого ушка предсердия не вытекала прозрачная жидкость. После декапитации животного были взяты различные отделы головного мозга, сердечная, почечная, селезеночная, легочная, печеночная ткани, а также поджелудочная железа, надпочечники и скелетная мышца. Ткани тщательно гомогенизировали водой в соотношении 1:2 (масса/объем) в механическом гомогенизаторе Уорринга и гомогенат центрифугировали 20 мин при 5000 об/мин. Из надосадочной жидкости осаждали белки сульфатом аммония в пределах 70—100% насыщения. Полученный осадок растворяли в веронал-мединаловом буфере, рН 8,6 и диализовали против воды в течение 48 ч. Лиофилизированные порошки тканевых экстрактов и сыворотки крови использовали для определения в них иммунной активности.

Иммуноцитохимическое исследование БНК осуществляли пероксидазно-антипероксидазным методом по общепринятой схеме с некоторыми модификациями [11]. Крыс фиксировали внутриаортальной перфузией смесью Замбони. После перфузии извлеченный мозг дополнительно фиксировали в течение ночи в смеси такого же состава. Срезы, приготовленные на вибротоме и многократно промытые в растворе солевого фосфатного буфера, неоднократно замораживали и оттаивали с целью некоторого повреждения мембран и для лучшего проникновения антител и других компонентов среды. Далее материал инкубировали со специфической антисывороткой БНК, разведенной 1:50. После реакции срезы постфиксировали 10 мин в 1%-ной забуференной четырехокиси осмии, обезвоживали и заливали в аралдит в виде плоско-параллельной заливки. Для блокирования неспецифического окрашивания срезы инкубировали 60 мин в 10%-ной козьей сыворотке. Эндogenous пероксидазы инактивировали инкубацией в 0,3%-ном растворе H_2O_2 в течение 15 мин.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что активными оказались иммунные сыворотки, взятые на 7-й и последующие дни иммунизации. Однако максимальный титр антисыворотки к БНК был достигнут через семь дней после реиммунизации. Антигенная гомогенность БНК была показана иммуноэлектрофоретически: полученная единственная дуга преципитации в случае использования в качестве антигена экстракта гипоталамической ткани свидетельствовала о моноспецифичности БНК-сыворотки. Уместно отметить, что почти полных экстрактов тканей различных органов (печени, сердца, почек, поджелудочной железы, селезенки, взятых в качестве антигена, реакция преципитации не была получена. Были поставлены также перекрестные реакции антисыворотки БНК с антигенами белок-носителей БНС и БНГ. Отсутствие дуг преципитации позволяло предположить строгую специфичность каждого белок-гормонального комплекса в отдельности.

Гель-фильтрация йодированного продукта БНК на сефадексе G-25 выявила наличие двух пиков: в первом из них содержался $[^{125}\text{I}]$ БНК, на долю которого приходится 35% общей радиоактивности, а второй пик состоял из свободного йода, выходящего через строго определенный промежуток времени (12 мин.).

На рис. 1 приведена стандартная кривая для радиоиммунологического определения содержания бычьего БНК в мозгу и различных органах.

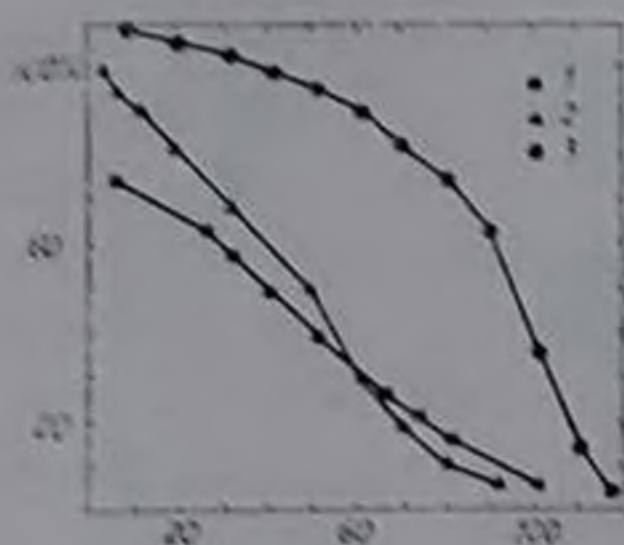


Рис. 1. Стандартная кривая для радиоиммунологического определения количественного содержания бычьего БНК (3). По оси абсцисс — содержание немеченого БНК и по оси ординат — процент связывания $[^{125}\text{I}]$ БНК с антисывороткой к бычьему антигену

Чувствительность метода в его обычном варианте позволяет достоверно измерить до 50 пг БНК-подобной ИР. Данные по распределению БНК суммированы в табл. 1 и 2. Как видно, БНК почти не обнаруживает достоверных различий в содержании в большинстве исследуемых регионов

Таблица 1

Распределение иммунореактивного белок-гормонального комплекса в мозгу

Анатомические части	Содержание БНК (мкг/г свежей ткани)
Кора больших полушарий	0,63 ± 0,07
фронтальная	0,90 ± 0,28
затылочная	0,75 ± 0,47
Таламус	1,00 ± 0,10
Гипоталамус	0,90 ± 0,17
Мозжечок	0,80 ± 0,60
Продолговатый мозг	0,77 ± 0,45
Нейрогипофиз	

мозга. Можно утверждать, что столь равномерное распределение БНК не объясняется присутствием крови, так как, во-первых, у перфузированных животных выявляется аналогичная картина, во-вторых, при пересчете на мг белка содержание БНК в сыворотке крови существенно ниже, чем определяемое в мозгу. Эти данные, свидетельствующие о преобладающем содержании БНК в мозгу (в 10^3 раз превышающее таковое в любом другом органе), однозначно утверждают о его специфичности для нервной

Таблица 2

Уровень иммуореактивного белок-гормонального комплекса
в различных тканях

Ткани	Содержание БНК (нг/г свежей ткани)
Сердце	$0,10 \pm 0,23$
Печень	$0,80 \pm 0,48$
Легкие	$0,13 \pm 0,05$
Селезенка	$0,07 \pm 0,02$
Скелетная мышца	$0,13 \pm 0,03$
Почка	$0,07 \pm 0,01$
Панкреатическая железа	0
Надпочечники	0

ткани. Высокое содержание БНК в гипоталамусе и мозжечке было показано и при иммуоцитохимическом исследовании его распределения в мозгу. Из ядер гипоталамуса наиболее четкое выявление реакции наблюдается в супрахиазматическом ядре, в составе которого всегда встречаются небольшие группы нервных клеток, проявляющих положительную реакцию на антитела к БНК. Четко окрашиваются цитоплазма и нервные отростки (рис. 2). Отдельные темные гранулы на рисунке, возможно, указывают на наличие реакции в синаптических окончаниях. Обнаружение же изучаемого комплекса в нервных отростках может свидетельствовать о возможности его миграции вдоль нервного волокна и последующей секреции в кровеносное русло. В клетках Пуркинье также наблюдалась интенсивная реакция на исследуемый белок, в остальных областях мозжечка реакция отсутствовала (рис. 3). Кажущиеся разногласия с результатами биологического тестирования, очевидно, можно объяснить тем, что по сравнению с общим объемом мозжечка монослой, занимаемый клетками Пуркинье, невелик, а вся активность, определяемая в мозжечке, представляет собой средние значения, относящиеся ко всей ткани в целом, а не к конкретным популяциям, в которых она сосредоточена.

Сопоставление концентраций БНК-подобной ИР в висцеральных органах показало, что, за исключением печени (табл. 2), его содержание в остальных тканях невелико и распределено относительно равномерно. Значительное содержание БНК-подобного материала обнаружено в крови — 13 нг/мл. Эти данные, по-видимому, могут свидетельствовать о выбросе гипоталамического БНК в общую циркуляцию при условиях, провоцирующих выход кардиоактивного нейrogормона «К». В пользу этого допущения убеждают полученные ранее данные об увеличении содержания другого кардиоактивного белок-гормонального комплекса — БНГ после

[illegible]