



УДК 616—001.8—053.1—06:616—008.9

ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ СУБКЛЕТОЧНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ГИПОКСИИ, ПЕРЕНЕСЕННОЙ НА РАННИХ СТАДИЯХ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

УВАРОВА Т. М., КУЗНЕЦОВА Т. В.
НИИ педиатрии АМН СССР, Москва

Развивающийся мозг предъявляет повышенные требования к кислородному и субстратному обеспечению. Это связано с чрезвычайно высокой интенсивностью процессов синтеза биологических макромолекул, активным морфо- и гистогенезом. Кислородная недостаточность на ранних стадиях индивидуального развития приводит к нарушению формирования, дифференцировки и созревания различных структур и метаболических путей в нервной ткани. Даже однократная тяжелая гипоксия, перенесенная в антенатальном или перинатальном периоде, вызывает длительно текущий, многостадийный патологический процесс [1]. К сожалению, работы, посвященные изучению данного вопроса, немногочисленны [2—6].

Нами было предпринято изучение полипептидного состава белков субклеточных образований мозга крыс, перенесших острую гипоксию в последней трети внутриутробного развития.

В экспериментах использовали крыс линии *Wistar*. Антенатальную гипоксию моделировали по оригинальной методике Жуковой, Пурина [7]. Под слабым эфирным наркозом у беременной крысы проводили срединную лапоротомию. Сквозь стенку матки, прозрачную в последней трети беременности, под сосуды пуповины подводили гладко отполированный металлический крючок. Осторожное подтягивание крючка позволяло полностью прекратить кровоток в сосудах пуповины. О состоянии плодов судили по частоте сердечных сокращений, регистрируемых на ЭКГ. Пережатие сосудов прекращали, когда частота сердечных сокращений плода достигала 45 ударов в мин при норме 250. В каждом опыте асфиксии подвергали одновременно четыре плода, остальные служили контролем. У контрольных плодов частота сердечных сокращений не падала ниже 220 ударов в мин. Плоды, перенесшие гипоксию, метили под-

кожным введением окрашенной массы, содержащей 10 г безводного ланолина, 3 г черной туши, 5000 единиц пенициллина. Оперативное вмешательство проводили на 18—19-й день внутриутробного развития. Самки донашивали беременность и рожали в срок.

Потомство исследовали на 30-й день жизни. Фракционирование коры больших полушарий и мозжечка проводили методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы по Hajos [8]. При разделении субклеточных частиц объединяли ткань коры больших полушарий от четырех, а ткань мозжечка—от двенадцати опытных или контрольных животных.

Выделенные и осажденные центрифугированием обогащенные фракции, условно обозначенные как «ядра» (обогащение по данным электронной микроскопии 52%), «митохондрии» (72% всех частиц фракции), «спинтосомы» (85% всех частиц фракции) и «миелин» (миелинизированные участки нервных волокон), ресуспендировали в 0,01М трис-НСI буфере, рН 6,8, содержащем 0,1%-ный тритон X-100, центрифугировали при 1000 g в течение 30 мин для отделения агрегированных частиц и уменьшения загрязнения фракций. Белок в надосадочной фракции определяли по Lowry и соизт. [9].

Электрофорез белков полученных фракций (100—200 мкг белка) в ПААГ в присутствии ДДС-Na и 2-меркаптоэтанола проводили по Laemmli, [10]. Маркерами величины M_r служили (в кД): лактальбумин—14, ингибитор трипсина—20, карбоангидраза—30, овальбумин—43, бычий сывороточный альбумин—67, фосфорилаза—94 («Pharmacia», Швеция).

Гели денситометрировали на сканирующем спектрофотометре «Helepa» (Франция).

Установлено, что в ядерной фракции коры больших полушарий у перенесших гипоксию крыс происходит увеличение относительного количества полипептидов с M_r 20—24 кД (на 69,6%), снижение относительного количества полипептидов с M_r 53—59 кД (на 31%). В аналогичной фракции мозжечка уменьшается относительное содержание полипептидов с M_r 36 (на 23,5%) и 46 кД (на 27,8%) рис., а)

Состав белков «митохондрий» в коре больших полушарий изменяется под влиянием антенатальной гипоксии следующим образом: снижается вклад белков с M_r 61—81 кД (на 26%), 31 кД (на 55,6%); увеличивается относительная концентрация полипептидов с M_r 25—30 (на 38,0%), 34 (на 45,0%), 47 (на 33,3%) и 54 кД (на 60,0%). В «митохондриях» мозжечка в M_r наблюдаются сходные изменения: уменьшается относительное содержание полипептидов с M_r 61—81 (на 24,6%) и 31 кД (на 17,2%), увеличивается относительная концентрация полипептидов с M_r 54 кД (на 37,8%). Кроме того, в составе белков «митохондрий» мозжечка снижается доля белков с M_r 47 кД (на 20,0%) и возрастает относительное содержание полипептидов с M_r 57 кД (в 2 раза) (рис., б). Изменения состава белков по фракции, обогащенной митохондриями, захватывают интервал с величиной M_r , характерной для основ-

ных субъединиц ферментов окислительного метаболизма, синтезирующихся непосредственно в митохондриях и на цитоплазматических рибосомах [11]. Изменение соотношений между полипептидами фракции, обогащенной митохондриями, найденное в данной работе, может отражать или же быть причиной вторичного ухудшения состояния энергетического метаболизма нервной ткани в отдаленные сроки после антенатальной гипоксии.

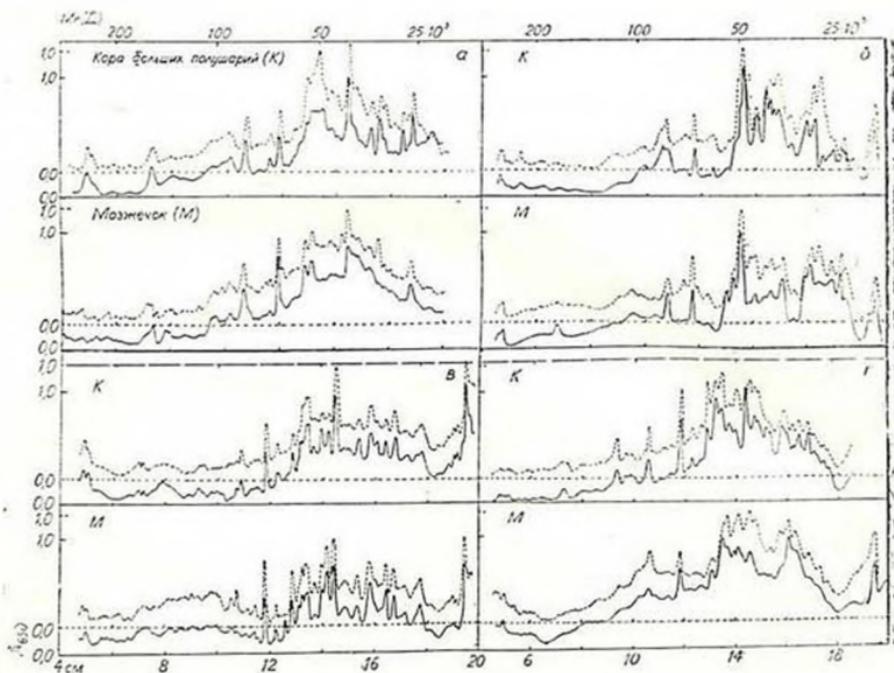


Рис. Электрофоретическое разделение белков фракций ядер (а), митохондрий (б), миелина (в) и синапсом (г) коры больших полушарий и мозжечка контрольных (1) и перенесших антенатальную гипоксию (2) крыс. По оси ординат—поглощение при длине волны 650 нм, по оси абсцисс—сверху—величина M_r (Д), снизу—длина геля, в см

В составе белков «миелина» мозжечка подопытных крыс происходит увеличение относительного количества белков с M_r 56 и 62 кД. В коре больших полушарий в составе белков «миелина» появляется дополнительная полипептидная фракция в области M_r 51—56 кД (рис. в). Этому интервалу M_r соответствуют обе субъединицы белка Вольфграма. Поскольку данный белок составляет более 20% всех белков миелина [12] и, по-видимому, представляет основную часть полипептидов этих фракций, можно предположить определенную роль этого специфического белка миелина в течение постгипоксического процесса.

Наиболее существенные изменения полипептидного состава белков после антенатальной гипоксии наблюдаются во фракции синапсом. В

составе белков этой субклеточной фракции коры больших полушарий происходят следующие изменения: повышается содержание полипептидов с M_r 38—39 кД (на 36,9%), появляется дополнительная полоса с M_r 34 кД, изменяется характер разделения полипептидов с M_r 43—46 кД, уменьшается относительное содержание полипептидов с M_r 59, 48 кД (на 25,4 и 21,8% соответственно). В синапсомной фракции мозжечка нарушения захватывают другие, чем в коре больших полушарий, диапазоны величины M_r : наблюдается снижение относительного количества белков с M_r 35 (на 20,4%) и 43 кД (на 20,0%), не выявляется фракция с M_r 41 кД, повышается относительная концентрация полипептидов с M_r 53—72 кД (на 22,9%) (рис. 2).

Таким образом, полученные в данной работе данные указывают на изменение состава белков исследованных субклеточных фракций головного мозга крыс, перенесших кислородное голодание на ранних стадиях онтогенеза.

Остается неясным, являются ли выявленные изменения патологическими или носят приспособительный характер. В любом случае изменение соотношения между полипептидами субклеточных фракций мозга свидетельствует о структурных нарушениях, наступающих в отдаленные сроки после антенатальной гипоксии.

PROTEINS OF BRAIN SUBCELLULAR FRACTIONS OF RATS EXPOSED TO HYPOXIA IN EARLY ONTOGENESIS

T. M. UVAROVA and T. V. KUZNETSOVA

Institute of Pediatrics, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The influence of prenatal hypoxia on protein composition of brain subcellular fractions has been studied by SDS-PAGE. Experiments were carried out on 30 days old Wistar rats. Prenatal hypoxia resulted in changes of the proportion between proteins of different molecular weights. Proteins of the synaptosomal and mitochondrial fractions underwent most significant changes. The electrophoretic protein patterns of the cerebral cortex and cerebellum after prenatal hypoxia were different.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жукова Т. П., Знаменская Е. И., Палснова Н. Г.—В кн.: Перинатальная патология (под ред. М. Я. Студеникина, Ю. Кюльца, Г. Эггерса), с. 45—82, М., Медицина, 1984.
2. Meberg A. Neonate, v. 39, № 5—6, p. 272—282, 1981.
3. Жукова Т. П., Сорокина Е. Г., Уварова Т. М. Вестн. АМН СССР, № 6, с. 25—31, 1985.
4. Gross J., Burgoyne R. D., Rose S. P. R. J. Neurochem., v. 37, № 1, p. 229—237, 1981.

5. Жукова Т. П., Сорокина Е. Г., Плат Х., Рихтер Н.—В кн.: Перинатальная патология (под ред. М. Я. Студеникина, Ю. Кюльца, Г. Эггедса), с. 83--104, М., Медицина, 1984.
6. Турова Н. Ф., Барышников В. А. Нейрохимия, т. 1, № 3, с. 249—253, 1982.
7. Жукова Т. П., Пурин В. Р. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 64, № 7, с. 123—125, 1967.
8. Hajos F. Brain Res., v. 93, № 3, p. 485--489, 1975.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. T., Farr A. L., Randall R. T. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
10. Laemmli U. K. Nature, v. 227, № 5259, p. 680—685, 1970.
11. Оасернюк Н. Д. Рост и воспроизводство митохондрий, М., Наука, 1978.
12. Туманова Ю. С., Прохорова М. И.—В кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ, М., Наука, 1981.

Поступила 4. III 1988

Белки нейронов и глии. Структура, функция и клиническое применение. Под ред. P. J. Naraugos, R. M. Cohen, I. C. Cambell, изд. Academic Press, Лондон, Англия, 1988 г., 382с.

Neuronal and Glial Proteins. Structure, Function and Clinical Application. Ed. by P. J. Naraugos, R. M. Cohen, I. C. Campbelle. Academic Press, London, England, 1988, 382c.

Книга представляет собой обзор, посвященный описанию идентифицированных к настоящему времени белков нейронов и глии, в том числе антигена Thy-1, факторов роста, PGP-9,5 и ассоциированных с миелином гликопротеинами. Клиническое исследование белков мозга особенно необходимо в таких случаях, как маркеры опухолей, дифференцировка и маркеры типов клеток. Книга необходима нейробиологам и молекулярным биологам, интересующимся молекулярными аспектами деятельности мозга и нервной системы, а также исследователям, занимающимся потенциальными возможностями клинического использования белков мозга. Среди заголовков отдельных разделов: «Методы идентификации и модификации белков мозга», «Растворимые белки нервной системы», «Мембранные белки нервной системы».