НЕЙРОХИМИЯ
т. 4, № 3, 1985

УДК 612.8.015. 612.014.3

БЕЛКОВЫЙ СПЕКТР ОДИНОЧНОГО НЕЙРОНА В КОНТРОЛИРУЕМОМ ФУНКЦИОНАЛЬНОМ СОСТОЯНИИ

КОГАН А. Б., КАМИНСКИЙ И. И., ГУСАТИНСКИЙ В. Н.

НИИ Нейрокибернетики Ростовского государственного университета им. М. А. Суслова

Методом микроэлектрофореза исследовали белковый спектр одиночного механорецепторного нейрона растяжения речного рака в состояниях адекватного возбуждения растяжением и торможения, вызываемого ГАМК. Показано, что число пиков на денситограмме белкового спектра заторможенного нейрона достоверно уменьшалось. Наиболее значительные изменения локализованы в области высокомолекулярных белков. Высказано предположение об относительной активации процессов «физиологического» протеолиза высокомолекулярных белков, сопровождающего длительно поддерживаемое состояние торможения в отличие от состояния возбуждения нейрона.

Проблеме взаимосвязи специфической функции нейрона с белковым метаболизмом в последние годы уделяли возрастающее внимание [1—4]. Её актуальность определялась не только теоретическим аспектом, но и практическим—возможностью управления функциональным состоянием клетки, в частности с помощью интермедиатов белкового метаболизма посредством регуляции уровней протеолиза и синтеза [5, 6]. Особое значение это направление работ приобрело в свете новых фактов о физиологической активности продуктов белкового протеолиза, способных влиять на процессы возбуждения и торможения нейронов [7—9]. Однако, несмотря на интенсивное изучение проблемы до настоящего времени остается невыясненным, каким образом изменяются протеолиз, синтез и транспорт внутринейрональных белков при различных функциональных состояниях нейрона и сопровождаются ли эти процессы сдвигами его белкового спектра.

Целью настоящей работы было микроэлектрофоретическое исследование белкового спектра медленноадаптирующегося механорецепторного нейрона растяжения речного рака (МНР) при его адекватном возбуждении дозированным растяжением или торможением ГАМК.

Материалы и методы

Из 2- или 3-х сегментов брюшка рака Astacus lepodactilus изолировали два симметричных МНР. Их приводили в состояние возбуждения, соответствующего частоте генерации импульсов 5 имп/сек, отводимых присасывающимся микроэлектродом. В кювету, где находилась одна из клеток, с помощью проточной системы вводили ГАМК. Её конечная концентрация в экспериментальной камере составляла 0,25 мМ. Процесс торможения контролировали по величине мембранного потенциала внутриклеточно введенным микроэлектродом. Продолжительность аппликации ГАМК составляла 10 мин, после чего оба анализируемых нейрона выделяли на холоду, солюбилизировали в микрокапиллярах над ПААГ при 55° в течение 2 ч в растворе следующего состава: 20 мМ трис-сульфатный буфер pH 8,4, 1%-ный ДДС-Na, 1%-ный меркаптоэтанол, 10%-ная сахароза, бромфеноловый синий [10]. Верхний электродный буфер, содержащий 50 мМ трис-глицина, pH 8,4 и 0,1%-ный ДДС-Na, соединяли с катодом и полученную смесь белков в капиллярах диаметром 250 мкм подвергали электрофоретическому разделению при стабилизированном напряжении 50 В в течение 30 мин; гель окрашивали Кумасси CBBR-250 [11]. Оптическую плотность окраски полученного белкового спектра измеряли на сканирующем микроденситометре МЦФУ-2 и регистрировали самописцем «Эндим».

В работе были использованы технические приёмы, позволившие повысить воспроизводимость результатов и снизить потери исследуемого вещества: а) формирование градиента ПААГ осуществляли для всей серии капилляров одновременно в одних и тех же условиях [12] с последующим подбором пар гелей, совпадающих по длине; б) была исключена операция гомогенизации нейрона и связанные с ней весовые потери; в) после перенесения нейрона под мениск солюбилизирующего раствора капилляр центрифугировали при g=73, что предотвращало прилипание нейрона к боковой стенке капилляра при последующих манипуляциях. Совокупность использованных способов позволила уменьшить критический размер нейронов, пригодных для анализа данным методом с 300÷400 мкм [13] до 50÷70 мкм.

Каждую пару денситограмм белковых спектров возбужденного и заторможенного нейронов подвергали количественной обработке по следующей схеме: а) подсчитывали общее количество пиков на денситограммах контрольного и подопытного нейронов и их разность; б) проводили сегментацию каждой денситограммы на участки, отличавшиеся резким, «возмущающим» изменением хода кривой [14]; в) подсчитывали число пиков в каждом сегменте денситограммы контроля и опыта и разности между ними; г) измеряли площади денситограмм и их отдельных сегментов, рассчитывали отношения площади каждого из сегментов к общей площади денситограммы, после чего определяли разности величин соответствующих отношений в денситограмме контрольного и подопытного нейронов. Достоверности различий проанализированных показателей рассчитывали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для сопряженных пар.

Результаты и обсуждение

Пара денситограмм белковых спектров заторможенного и возбуждённого нейронов представлена на рисунке. Он иллюстрирует также границы 4-х сегментов денситограмм, количество пиков в каждом из них и разности между количеством пиков в опыте и в контроле. Результаты статистической обработки количества пиков во всех исследованных парах нейронов представлены в табл. 1. Из приведенных данных следует, что в денситограммах белковых спектров нейронов, находив-

шихся в состоянии торможения, число пиков достоверно уменьшалось по сравнению с контролем. Для выяснения локализации происшедших в белковом спектре изменений подсчитывали количество пиков в каждом сегменте денситограмм контроля и опыта. Результаты подсчёта и разности количества пиков в соответствующих сегментах показывают, что достоверное уменьшение числа пиков происходило в 3-м и 4-ом сег-

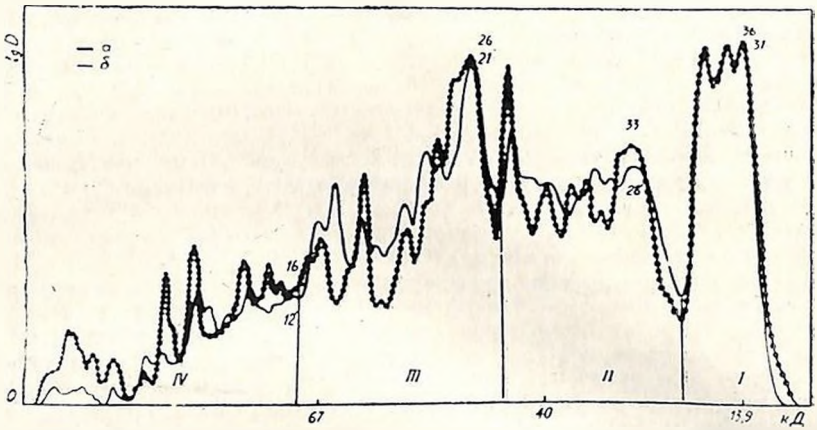

Рис. Денситограммы белковых спектров пары симметричных нейронов. *а*—контроль, частота импульсации 5 Гц; *б*—опыт, торможение импульсной активности ГАМК $2{,}5\times10^{-4}$ М в течение 10 мин. По оси абсцисс—величина M_r белков в кД; белки-маркёры: лизоцим куриного яйца—13,9 кД, пероксидаза хрена—40 кД, бычий сывороточный альбумин—67 кД; I, II, III, IV—номера сегментов денситограмм, цифрами на кривых указаны номера пиков. По оси ординат—lg от величины оптической плотности (lgD)

ментах денситограмм, где располагались субъединицы белковых молекул с величиной M_r свыше 40 и 65 кД соответственно.

Изменение числа пиков в указанных сегментах денситограмм сопровождалось изменением их площадей. Расчёт отношений площадей каждого из сегментов к площади всей денситограммы в контроле и опыте, сравнение разностей этих отношений во всех парах изученных нейронов не выявили значимых отклонений, но позволили установить, что минимальный разброс исследуемых величин имел место во 2-х сегментах денситограмм. Поэтому последующие сопоставления площадей отдельных сегментов в парах проводили сравнительно с площадью 2-го сегмента. Результаты расчёта отношений площадей 4-х сегментов к площади 2-го стабильного сегмента и последующая оценка разности между относительными площадями контрольных и опытных сегментов денситограмм в каждой паре представлены в табл. 2. Из этих данных следует, что площадь 4-го сегмента денситограммы белкового спектра нейронов в состоянии торможения достоверно умень-

шалась сравнительно с аналогичным сегментом в контроле. Кроме того, проявлялась тенденция к увеличению площади, занимаемой 3-м сегментом денситограммы в том же функциональном состоянии.

Таблица 1

Количество пиков денситограмм белковых спектров в парах симметричных нейронов

№ пары	К — контроль О — опыт	Количество пиков денситограммы	Δ	Количество пиков в 1-м сегменте денситограммы	Δ	Количество пиков во 2-м сегменте денситограммы	Δ	Количество пиков в 3-м сегменте денситограммы	Δ	Количество пиков в 4-м сегменте денситограммы	Δ
1	к	23	1	3	0	2	—1	12	0	6	2
	о	22		3		3		12		4	
2	к	27	4	3	0	3	0	12	3	9	1
	о	23		3		3		9		8	
3	к	39	4	3	0	5	1	15	0	16	3
	о	35		3		4		15		13	
4	к	37	5	3	0	7	1	9	3	18	1
	о	32		3		6		6		17	
5	к	36	5	3	0	7	0	10	1	16	4
	о	31		3		7		9		12	
6	к	32	2	3	0	4	—3	9	1	16	4
	о	30		3		7		8		12	
7	к	33	2	3	0	4	—1	13	1	13	2
	о	31		3		5		12		11	
8	к	46	13	6	2	11	4	15	5	14	2
	о	33		4		7		10		12	
9	к	33	2	3	0	10	0	9	0	11	2
	о	31		3		10		9		9	
10	к	32	1	3	0	6	—1	9	0	14	2
	о	31		3		7		9		12	
11	к	23	2	3	0	9	1	6	—1	11	2
	о	27		3		8		7		9	
12	к	32	—1	3	0	11	0	6	—2	12	1
	о	33		3		11		8		11	
13	к	30	1	3	0	8	0	3	—1	16	2
	о	29		3		8		4		14	
14	к	30	3	3	0	9	1	6	0	12	2
	о	27		3		8		6		10	
15	к	35	1	3	—2	8	0	6	—2	18	5
	о	34		5		8		8		13	
16	к	42	17	3	0	9	7	14	3	16	8
	о	25		3		3		11		8	
17	к	35	3	3	0	8	0	18	2	11	1
	о	32		3		8		11		10	
			$p<0,01$		$p>0,05$		$p>0,05$		$p<0,05$		$p<0,01$

Примечание. Δ—разность между числом пиков в паре симметричных нейронов

Таким образом, торможение нейронов вследствие 10-минутной аппликации ГАМК сопровождалось уменьшением числа пиков электрофореграммы и количества белков высокомолекулярных фракций. Такой результат мог быть следствием снижения уровня синтеза белков или пропорционального снижения и синтеза и протеолиза при относительном преобладании протеолиза высокомолекулярных белков. Поскольку ранее нами было установлено снижение уровня синтеза и автолиза белков в полимодальных нейронах при длительном их тор-

можении [15], есть основания предполагать, что и при торможении периферического нейрона имеет место сходный процесс, сопровождаемый избирательной активацией протеолиза высокомолекулярных белков. При этом уровень активности соответствующих эндопептидаз может регулироваться внутриклеточными концентрациями Ca^{2+} [16].

Таблица 2

Величины относительных площадей 4-х сегментов денситограмм в парах симметричных нейронов и их разности

№	Отношение площади 4-го сегмента к площади 2-го сегмента денситограммы белкового спектра		Разность
	контрольный нейрон	опытный нейрон	
1	0,557	0,429	0,13
2	0,658	0,612	0,05
3	0,297	0,301	0
4	0,394	0,349	0,05
5	1,118	1,071	0,05
6	0,187	0,248	−0,06
7	0,222	0,154	0,07
8	0,116	0,031	0,08
9	2,221	1,702	0,52
10	2,067	1,618	0,45
11	1,986	1,731	0,26
12	2,153	1,855	0,3
13	2,358	1,757	0,6
14	1,617	2,344	−0,73
15	2,07	1,874	0,2
16	1,905	1,833	0,07
17	1,232	1,318	−0,09
			$p < 0,05$

Фрагменты высокомолекулярных белков, соответствующих 4-му сегменту денситограммы, если бы они образовались в достаточном количестве, должны были бы увеличить площади пиков остальных сегментов денситограмм. Однако такая тенденция отмечена только в 3-м сегменте, но при этом число пиков оказалось меньшим, чем в соответствующем сегменте контрольной денситограммы. Этот факт может свидетельствовать о том, что величины M_r появившихся белковых фрагментов соответствуют межпиковым минимумам денситограммы данного сегмента, при заполнении которых возрастала площадь под кривой и не происходило формирования новых пиков.

В результате протеолиза высокомолекулярных белков возможно также появление низкомолекулярных пептидов, не выявляемых в условиях нашего эксперимента. Поскольку уменьшение площади денситограммы 4-го сегмента больше, чем возрастание площади 3-го, а в 1- и 2-м достоверные изменения не были выявлены, такое предположение небезосновательно. Не исключено, что некоторые из новообразованных пептидов могли бы участвовать в процессах торможения нейрона. В этом случае должны потенцироваться эффекты ГАМК и

пептидов, возникших в результате её действия, что увеличивает продолжительность торможения, формируя «следовую» реакцию.

Авторы выражают признательность проф. М. Б. Штарку и сотрудникам руководимой им лаборатории Института автоматики и электрометрии СО АН СССР (Новосибирск) за помощь в освоении методики микроэлектрофореза белков.

PROTEIN SPECTRE OF A SINGLE NEURON IN A FUNCTIONALLY CONTROLLED CONDITION

KOGAN A. B., KAMINSKY I. I., GUSATINSKY V. N.
Research Institute of Neurocybernetics, Rostov State University

Protein spectrum of a single neuron either excitated or inhibited by GABA has been investigated by microelectrophoresis technique. The number of peaks in the densitogram of protein spectrum of an inhibited neuron decreased reliably. Most significant changes in the densitogram were dectected in the region of high M_r proteins. It was suggested that relative activation of processes of "physiological" proteolysis of high M_r proteins accompanies prolonged inhibition rather than excitation of a neuron.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ашмарин И. П.* Загадки и откровения биохимии памяти. Л., Изд-во ЛГУ, 1975.
2. *Штарк М. Б.* Иммунонейрофизиология, Л., Медицина, 1978.
3. *Алексидзе Н. Г.*—В сб.: Биохимия животных и человека, т. 4, с. 4—11, Киев, Наукова думка, 1980.
4. *Еропкин М. Ю.* Успехи соврем. биол., т. 95, № 1, с. 65—83, 1983.
5. *Палладин А. В., Белик Я. В., Полякова Н. М.* Белки головного мозга и их обмен, Киев, Наукова думка, 1972.
6. *Goldberg A. L., John A. C. St.* Annu Rev. Biochem., v. 45, p. 747—803, 1976.
7. Proteases and Biological Control (eds. Reich E., Rifkin D. B., Show K). Cold Spring Harbor Laboratory, 1975.
8. *Ашмарин И. П., Еропкин М. Ю., Ковалева Т. А., Рожанец В. В.* Молекуляр. биология, т. 12, с. 963—973, 1978.
9. *Acher R.* Evolution of neuropeptides.—Trends in Neurosci., v. 4, p. 225—229, 1981.
10. *Osborne N. N., Rüchel P.* J. Chromatogr., v. 105, p. 197—200, 1975.
11. *Vesterberg O.* Biochim. et Biophys. acta v. 243, p. 345—348, 1971.
12. *Dames W., Maurer H. R.*—In: Electrophoresis and isoelectricfocusing in polyamide gel. (eds. Allen R. C., Maurer H. R., W de Gryter, Berlin), p. 221—231, N. Y. 1974.
13. *Froutali N., Gainer H.*—In: Peptides Neurophysiol., p. 259—294, N. Y.—London, 1977.
14. *Браверман Э. М., Мучник И. Б.* Структурные методы обработки эмпирических данных, М., Наука, 1983.
15. *Гусатинский В. Н., Кондратьева Л. А.*—В сб.: Проблемы нейрокибернетики, с. 261, Изд-во Ростовского госуниверситета, 1983.
16. *Рева А. Д., Березин В. А., Генгин М. Т.*—В сб.: Биохимия животных и человека, т. 4, с. 57—63, Киев, Наукова думка, 1980.

Поступила 7. I 1985