

УДК 547.963.4:576.363:591.3

ЭМБРИОЛОГИЯ

Е. М. Каралова

Цитохимическое количественное исследование белков в клетках
Пуркинье мозжечка эмбрионов кур в процессе дифференцировки

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР Э. А. Давтяном 14/VI 1974г.)

Функционально-цитохимическое изучение нервных клеток в эмбриогенезе представляет большой интерес, так как позволяет выявить связи между морфологией и цитохимией специализирующихся нейронов. К настоящему времени накопилось много работ по возрастной гистохимии нейронов (¹⁻³). В основном это работы, выполненные с применением качественных методик, а работы, характеризующие корреляцию количества различных белков с теми или иными перестройками в зародышевых тканях единичны (^{4,5}). Это обстоятельство побудило нас провести исследование содержания и концентрации белков и их функциональных групп в перикарионе клеток Пуркинье эмбрионов кур с момента их первичной дифференцировки из нейробластов и до вылупления включительно. Исследуемый объект интересен и тем, что мозжечок у кур приобретает функциональную зрелость еще в эмбриогенезе (⁶).

Кусочки мозжечка эмбрионов кур (10—21 сутки развития) фиксировали в смеси формалин—спирт—уксусная кислота (9:3:1) и готовили срезы толщиной в 5 мк. Для выявления общего белка препараты окрашивали амидочерным 10Б (⁷), а для определения соотношения основных и кислых белков использовали реакцию зеленого прочного на аминокислоты (⁸). Окраску белковых SH-групп проводили 2,2'-диоксидом, 6,6'-динафтил-дисульфидом (ДДД) с докрасиванием диазониевой солью прочного черного К (⁹). Общий белок фотометрировали на зондовом цитоспектрофотометре одноволновым методом ($\lambda = 620$ нм) также как и SH группы ($\lambda = 557$ нм). При фотометрии NH_2 -групп использовали двухволновый метод ($\lambda_1 = 595$ нм, $\lambda_2 = 557$ нм). Измерения проводили в 100 клетках (по 3 эмбриона) на возраст. Все данные обрабатывались статистически. Приводимые цифровые значения даны в условных сравнимых единицах.

Полученные данные выявили динамику концентрации и количества белков в перикарионе клеток Пуркинье в процессе их роста и дифференцировки. За исследуемый период количество общего белка

увеличивается более, чем в три раза и во столько же раз увеличиваются размеры перикариона (рис. 1). Вместе с тем наблюдается некоторая периодичность в нарастании количества белка: так, вплоть до завершения переходной фазы зародышевого периода развития (14 сутки эмбриогенеза) имеет место интенсивный синтез белка, и его количество в перикарионе увеличивается в 1,5 раза, затем, до 17 суток эмбриогенеза держится, примерно, на одном уровне, после чего вновь наблюдается резкая активация синтеза белка (его количество возрастает в 2 раза к моменту вылупления). Выход кривой на плато вероятно обусловлен усиливающимся транспортом белка в аксон (^{10,11}).

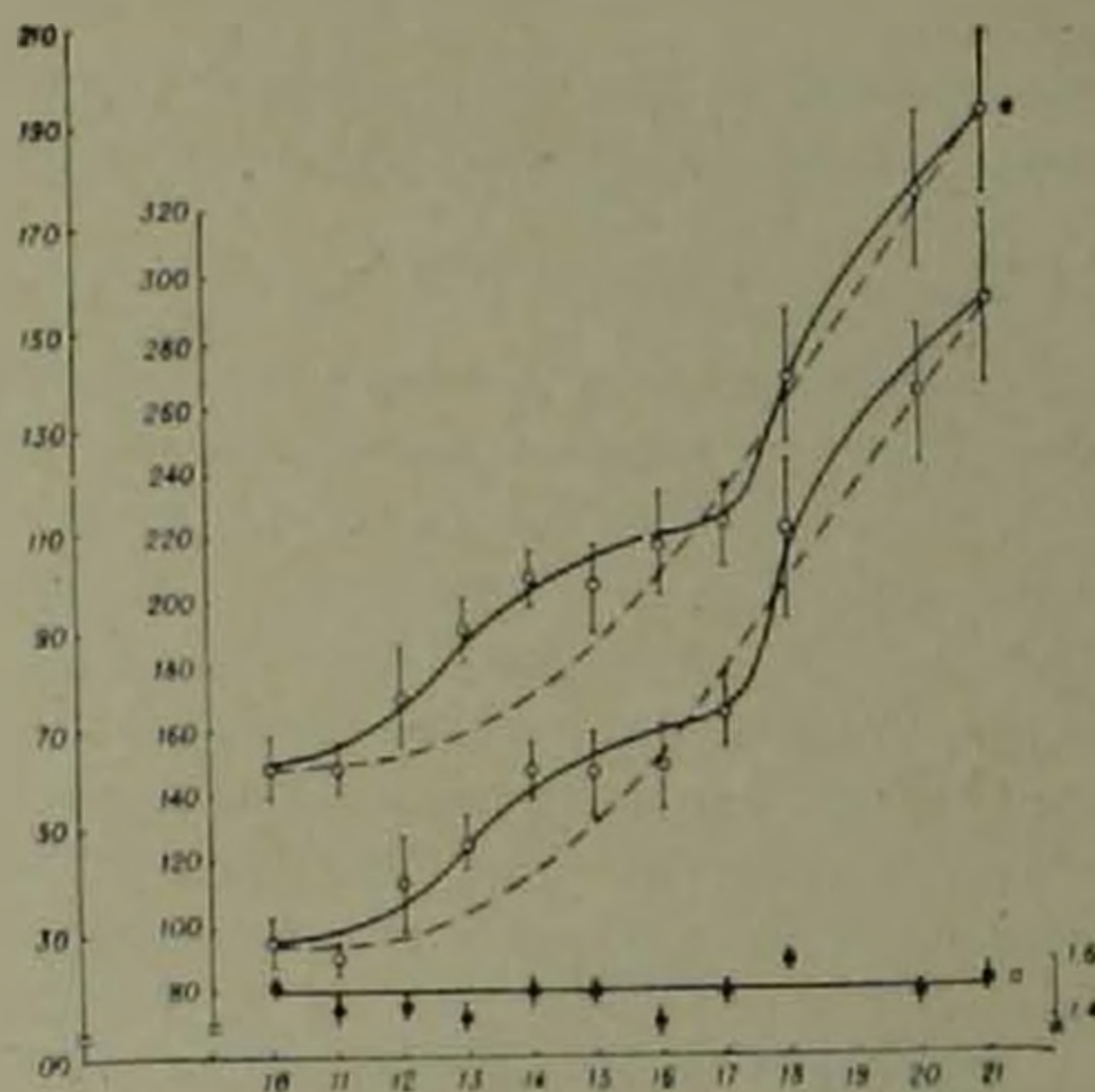


Рис. 1. Концентрация (а), и относительное содержание (б) и площадь цитоплазмы (в) клеток Пуркинье в процессе их дифференцировки и специализации в эмбриогенезе кур.

На всех рисунках данной статьи —○— количество вещества; —●— его концентрация; t—возраст эмбрионов в сутках

В это же время усиливаются процессы дифференцировки клеток Пуркинье, формируется тигроид и нейрофибриллы, а, как известно, процессы роста и дифференцировки находятся в определенных конкурентных взаимоотношениях. Концентрация общего белка в перикарионе нейробласта и зрелого нейрона не меняется. Незначительные ее колебания в течение эмбриогенеза скорее всего являются отражением автоколебательных процессов (¹²). Соответственно нарастанию количества белка в перикарионе увеличивается содержание белковых SH-групп, что вполне закономерно, так как тиоловые соединения являются необходимым компонентом как структурных белков, так и большинства ферментов (^{13,14}). Возрастание концентрации SH-групп на 14—18 сутки эмбриогенеза вероятнее всего связано с началом функциональной деятельности исследуемых клеток (рис. 2). Известно, что

переход нервных клеток от относительного покоя к возбуждению вызывает изменение структуры белковых молекул, сходное с процессом

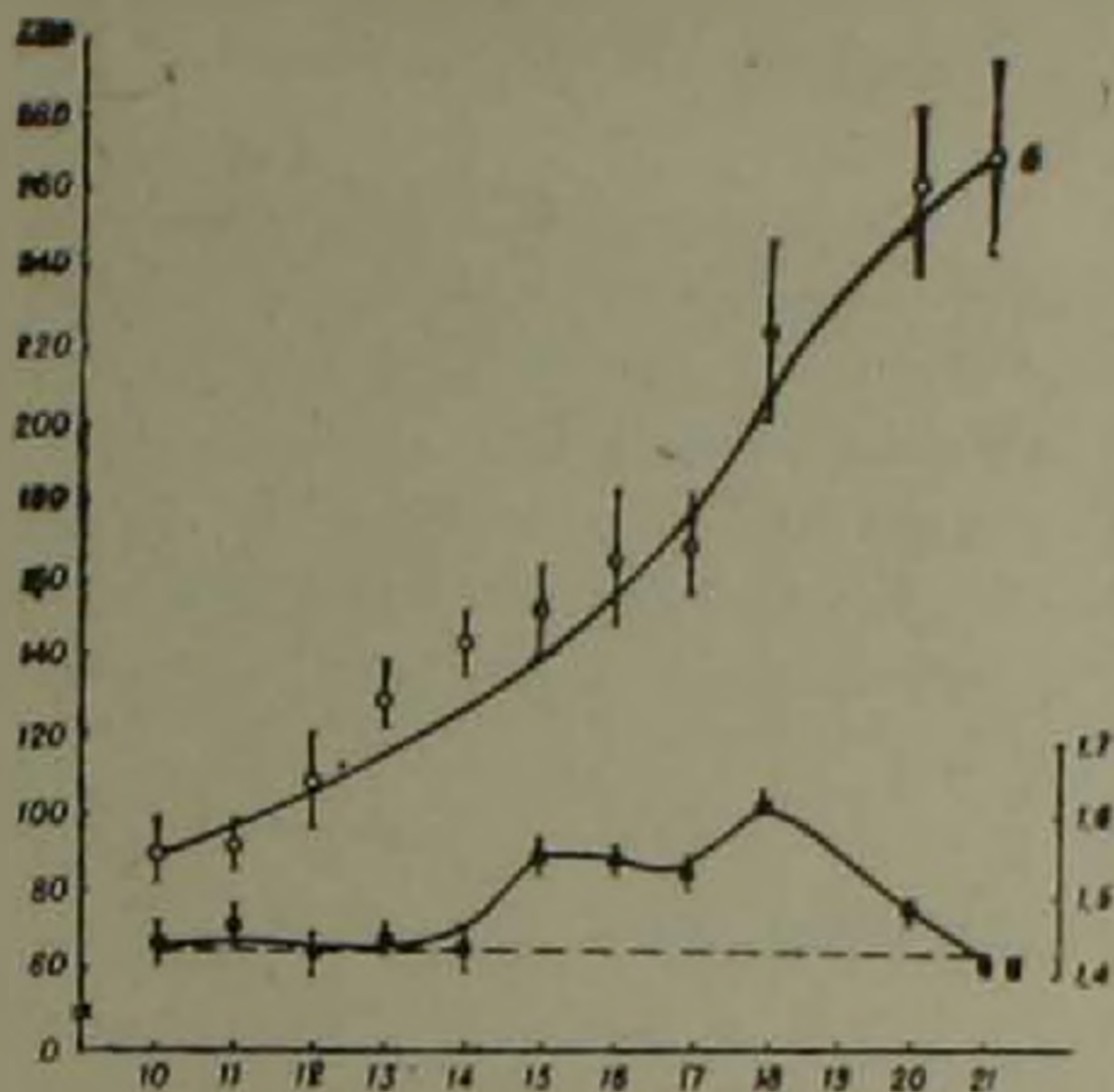


Рис. 2. Концентрация (а) и относительное содержание (б) белковых SH-групп

обратимой денатурации белка и сопровождающееся демаскированием белковых SH-групп (^{15,16}). Известно также, что в зависимости от соотношения количества амидных и карбоксильных групп изменяется

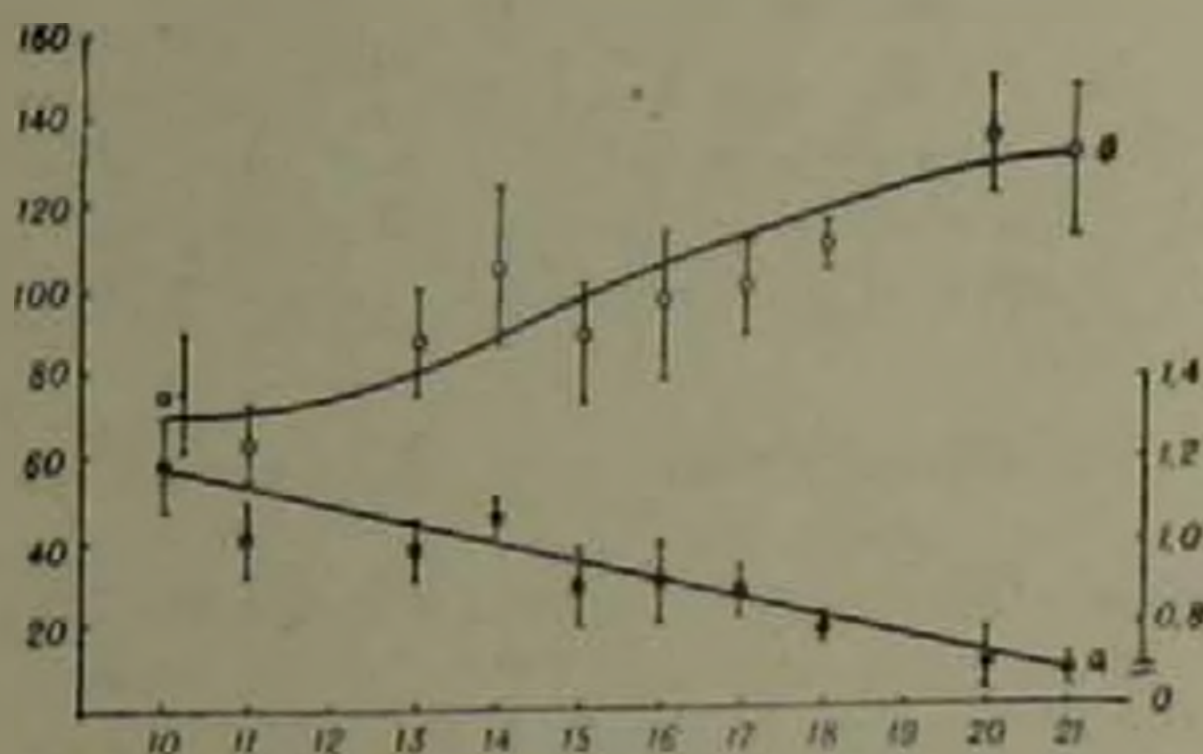


Рис. 3. Концентрация (а) и относительное содержание (б) аминокрупп цитоплазматического белка

заряд белковой молекулы и ее конфигурация, что влияет на функцию мозга (¹⁷). По мере эмбрионального развития меняется не только количество белков, но и их качественный состав (^{18,19}), поэтому наши данные, характеризующие динамику соотношения основных и кислых белков в перикарионе клеток Пуркинье представляют определенный интерес. Они показывают, что количество красителя, связавшегося с аминокруппами белков перикариона клеток Пуркинье в процессе их дифференцировки, увеличивается, но не столь интенсивно как идет увеличение количества общего белка (рис. 3). Концентрация же

NH₂-группы уменьшается почти вдвое, что свидетельствует о возрастании удельного количества кислых белков, содержащих много дикарбоновых аминокислот. Отмеченные нами факты согласуются с данными о нарастании концентрации дикарбоновых аминокислот в коре головного мозга в период интенсивного роста нервных клеток (²⁰).

Итак, в процессе морфологической и функциональной дифференцировки клеток Пуркинье мозжечка эмбрионов кур происходит интенсивное увеличение количества общего белка, увеличение концентрации белковых SH-групп и изменение в составе белков перикариона. Динамика исследованных нами веществ обнаруживает периодичность, тесно связанную с прохождением эмбрионом определенных периодов в своем развитии и отражает общую направленность биохимических и физиологических процессов в целостной системе развивающегося организма.

Институт зоологии
Академии наук Армянской ССР

Ե. Մ. ԿԱՐԱՍՅԱՆ

Հավի սաղմի ուղեղիկի Պուրկինյեի բջիջների ցիտոքիմիական փոփոխականության ուսումնասիրություն

Հավի սաղմի (10—21 օրեկան) ուղեղիկի Պուրկինյեի բջիջների մորֆոֆունկցիոնալ դիֆերենցիան և մասնագիտացման ժամանակաշրջանի ցիտոֆոտոմետրիկ ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ այդ ժամանակ ընդհանուր սպիտակուցի բանակը բարձրանում է բջիջի մարմնի անման հետ համաչափ, կոնցենտրացիայի հարաբերաբար կայունության պայմաններում: Փոփոխվում է հիմնային և թթու սպիտակուցների հարաբերակցությունը, զգալի չափով աճելանում է սպիտակուցների SH-խմբերի բանակը: Սպիտակուցների սինթեզի ինտենսիվացման և նրանց ափսոսելի կայուն բարձրացման ժամանակաշրջանը համընկնում է նեյրոնների մորֆոֆունկցիոնալ հասունացման ժամանակի հետ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ Б. В. Кедровский, Цитология белковых синтезов, М., 1959. ² Л. Б. Левинсон, Докл. на конск. уч. ст. д. биол. наук, М., 1961. ³ Н. М. Буйдик, Морфологические и химические изменения в процессе развития клетки, Рига, 1967. ⁴ М. Е. Неверова, Кандидатская диссертация, М., 1968. ⁵ Е. И. Большова, Морфогенез и структура органов человека и животных, Минск, 27, 1970. ⁶ Л. Б. Левинсон, М. Е. Неверова, Морфологические и химические изменения в процессе развития клетки, Рига, 1967. ⁷ А. А. Брумберг, Л. Э. Певзнер, Цитология, 14 (5), 674, 1972. ⁸ А. Д. Deltsh и кн. Введение в количественную цитохимию, изд. „Мир“, 359, 1969. ⁹ G. F. Bahr, и кн. Введение в количественную цитохимию, изд. „Мир“, 373, 1969. ¹⁰ S. C. Bondy, Exp. Brain Res., 13, (2), 127, 1971. ¹¹ А. Н. Мезенцев, О. В. Мещинова, Успехи совр. биол., 1, (4), 62, 1972. ¹² E. Bunnling, Die physiologische Uhr, Berlin, 1958. ¹³ М. Беретон, Гистохимия ферментов, изд. „Мир“, М., 1966. ¹⁴ М. Диксон, Э. Узбб, Ферменты, изд. „Мир“, М., 1966. ¹⁵ Б. И. Гольдштейн, О влиянии сульфгидрильных групп на биологические свойства тканевых белков, Киев, 1955. ¹⁶ И. Б. Краснов, Бюлл. эксп. биологии и медицины, 55, (10), 50, 1963. ¹⁷ А. С. Чекунов, Структура и функции нервной системы, М., 1965. ¹⁸ А. В. Палладин, Проблемы нейробиологии, М.—Л. „Наука“, 5, 1966. ¹⁹ E. Elstein, K. Dalal J. Czeley, Brain Res., 18 (1) 35, 1970. ²⁰ Р. Н. Худякова, Тр. 9 Научной конференции по возр. морфологии, физиологии и биохимии, часть II, М., 27, 1972.