

Л. И. КОРОЧКИН, С. М. СВИРИДОВ, В. Н. ИВАНОВ,
Е. Н. МАЛЕЦКАЯ, Т. К. БАХТИНА

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА S-100
В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ДВУХ ЛИНИЙ
В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 1 II 1971)

Ранее нами установлено, что постнатальный нейроцитогенез сопровождается появлением в головном мозге крыс пяти органоспецифических антигенов (1, 2).

Один из них был идентифицирован как белок S-100, выделенный Муром и описанный рядом авторов (3-5).

Целью настоящей работы было исследование распределения белка S-100 в клеточной популяции ткани головного мозга крыс двух линий в ходе постнатального онтогенеза. В опыт были взяты крысы двух линий, выведенных в лаборатории Московского университета из породы Вистар (6), чувствительных к звуку и резистентных к нему. Первые (линия КМ) в ответ на электрический звонок дают судорожный эпилептиформный припадок. В общей сложности исследовано 25 животных. Исследованы следующие возрастные группы крыс обеих линий: новорожденные, 5, 7, 12, 15, 21 день, взрослые.

Белок S-100 выделяли из водорастворимого экстракта головного мозга крыс. Выделение проводили в два этапа: 1) препаративный электрофорез в агарозном геле (7), 2) препаративный электрофорез в полиакриламидном геле (8). Процедура контролировалась аналитическим электрофорезом в 12% полиакриламидном геле. Молекулярный вес белка определяли по методу (9). Моноспецифическую анти-S-100-сыворотку получали от кроликов по методу Кеслера и Левина (10).

Специфичность полученной сыворотки проверяли реакцией двойной иммунодиффузии в агарозе с экстрактами из гетерологичных органов и с экстрактом из головного мозга крысы. Моноспецифичность сыворотки тестировали в иммуноэлектрофорезе как с водным экстрактом из головного мозга, так и с чистым белком. Иммуногистохимически по непрямому методу Кунса (11) исследованы сенсомоторная кора головного мозга, гиппокамп, ядро Дейтерса и мозжечок. Срезы толщиной 3 м были получены как из залитой в парафин (12), так и из замороженной ткани мозга в криостате.

Как видно из рис. 1, полученный белок занимал крайнее анодное положение при электрофорезе в 12% полиакриламидном геле, а антисыворотка, полученная на него, давала единственную дугу преципитации как с полученным белком, так и с водным экстрактом из головного мозга крысы. Реакции иммунодиффузии и иммунофлюоресценции с суммарным водным экстрактом и срезами из гетерологичных органов (печень, почки, селезенка, сердце) были отрицательны.

Молекулярный вес, определенный при хроматографии на колонке с сефадексом Г-100, оказался равным 21 000, что соответствует литературным данным о молекулярном весе белка S-100 (4).

Органоспецифичность белка, характерное положение на электрофореграмме, а также данные измерения молекулярного веса, позволяют с большей вероятностью считать выделенный белок S-100-белком. Кроме того, на тождественность полученного белка S-100-белку указывает однозначность иммунофлюоресценции при применении анти-S-100-сыворотки Левина и полученной нами сыворотки.

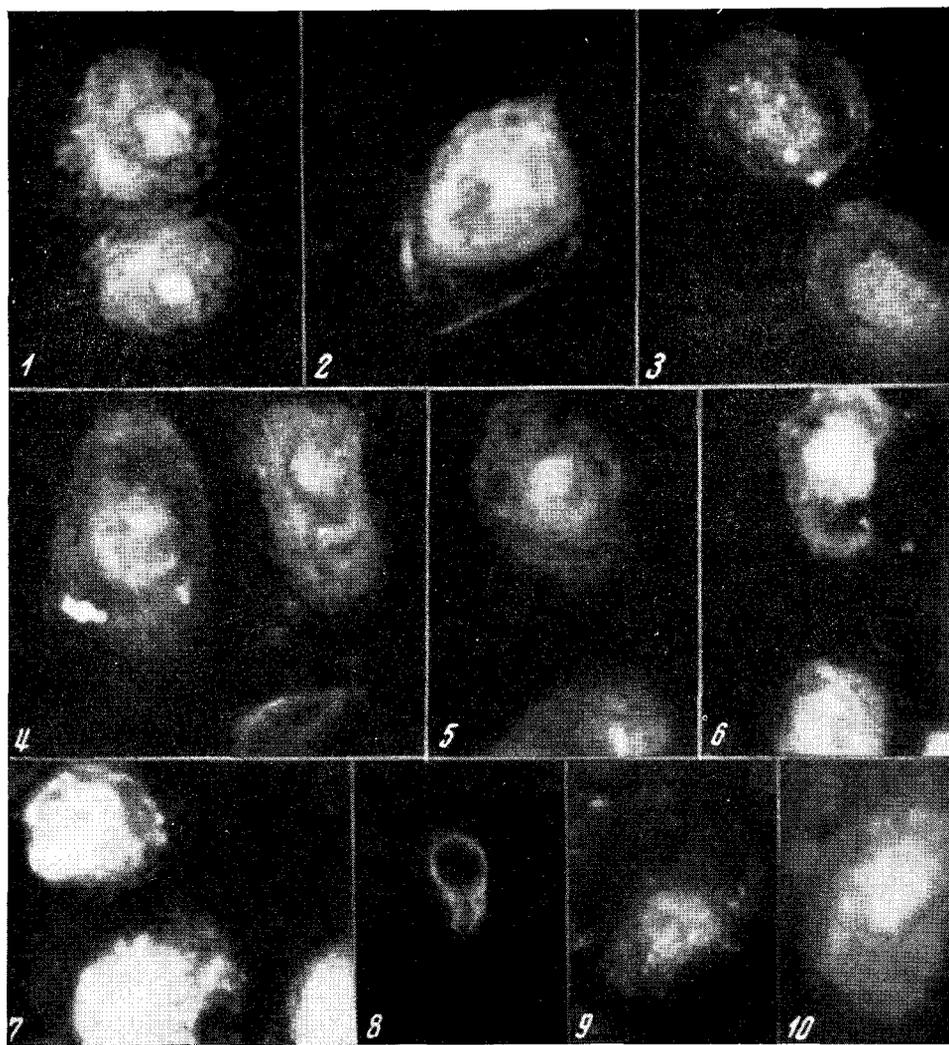


Рис. 2. Срезы коры головного мозга взрослой крысы, обработанные анти-S-100-сывороткой и проявленные ослиной антикриличьей сывороткой, меченной флюоресцеин-изотиоцианатом. 1-7 — нервные клетки 5 слоя коры головного мозга, обработанные анти-S-100-сывороткой, полученной в Институте цитологии и генетики; 8 — глиодит, выявленный тем же способом; 9, 10 — нервные клетки V слоя коры головного мозга, обработанные анти-S-100-сывороткой, присланной доктором Левиным (США). Обращает на себя внимание, что в нервных клетках положительно реагируют с анти-S-100-сывороткой ядра, в глиоците — цитоплазма

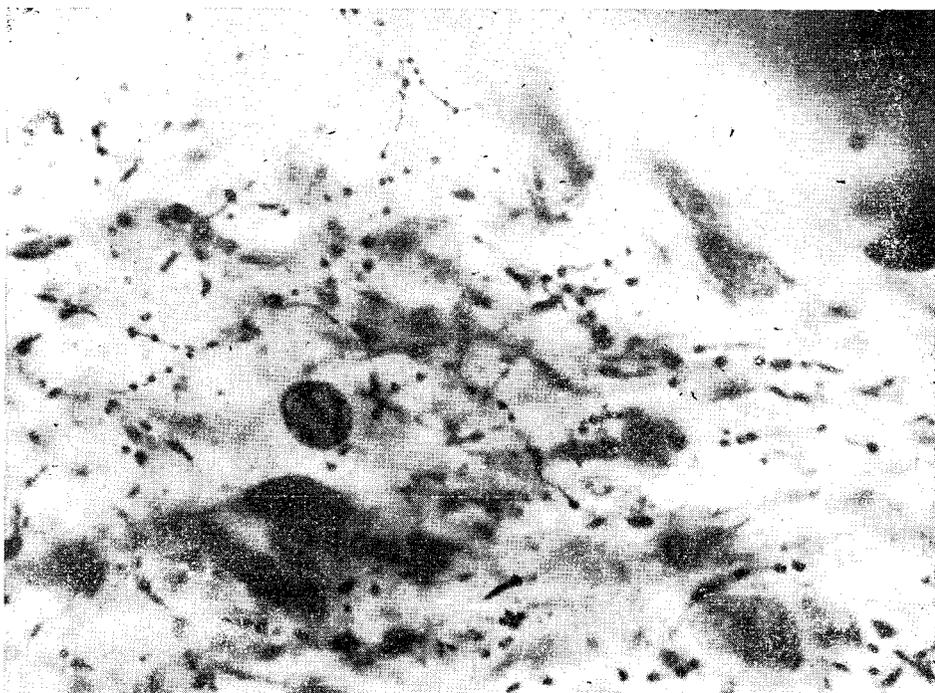


Рис. 1. Распад претерминалей в латеральной гипоталамической области вблизи кровеносного сосуда через 9 суток после экстирпации зон S_1 , S_2 . Паута — Гигакс. Об. 40 \times , ок. 10 \times , ФМН-2

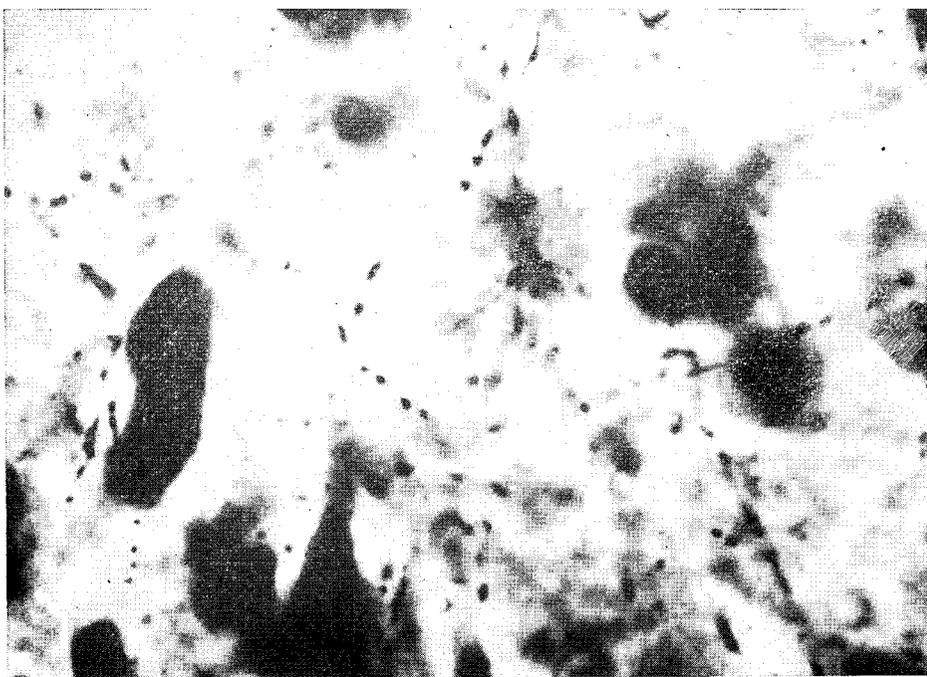


Рис. 2. Дегенерирующие претерминады в вентро-медиальном ядре гипоталамуса через 6 суток после экстирпации зон S_1 , S_2 . Паута — Гигакс. Об. 60 \times , ок. 10 \times , ФМН-2

Анализ гистологических срезов исследованных зон головного мозга продемонстрировал, в соответствии с литературными данными, что S-100-белок локализуется в ядрах нейронов и в цитоплазме глиоцитов (рис. 2). Отмеченная особенность, пожалуй, наиболее отчетливо выражена в коре головного мозга (рис. 2). В пирамидах гиппокампа и особенно в клетках Пуркиньи мозжечка и гигантских нейронах ядра Дейтерса иногда можно заметить слабое свечение на периферии перикариона. Отмечено два типа распределения белка S-100 в ядрах нервных клеток: 1) диффузное, более или менее равномерное и 2) неравномерное распределение. В последнем случае нередко выявляется интенсивное свечение ядрышка (рис. 2). Концентрация белка S-100 в глиальных клетках, по-видимому, достаточно высока, поскольку свечение узкой цитоплазматической зоны, опоясывающей ядро глиоцита, весьма интенсивно (рис. 2).

Не было найдено различий между взрослыми крысами линий резистентной и чувствительной к звуку. В то же время отмечены некоторые особенности появления белка S-100 в головном мозге этих линий в процессе постнатального онтогенеза. В обоих случаях в головном мозге новорожденных животных не выявляется выраженного свечения. Начиная с пятого дня жизни в гиппокампе и в ядрах продолговатого мозга — варолиева моста в ядрах отдельных нервных клеток и особенно в цитоплазме глиоцитов появляются признаки свечения, превышающего фон. Особенно отчетливо эти признаки наблюдаются в двигательных ядрах продолговатого мозга. В коре головного мозга лишь очень редко удается найти слабо светящиеся клетки. На 7 и 12 день постнатальной жизни в отмеченных отделах головного мозга можно обнаружить хорошо светящиеся клетки (ядра в нейронах, цитоплазма в глие). Впрочем, таких клеток немного. По-видимому, в этот период отчетливо выявляется гетерогенность популяций нервных клеток, выражающаяся в асинхронном накоплении белка S-100.

К 12 дню жизни животных отмечается некоторое различие между резистентной и чувствительной к звуку линиями. У первых достаточно явно заметны светящиеся ядра нейронов и глиоплазма. У вторых такого свечения не выявляется, лишь иногда обнаруживаются единичные клетки со следами свечения. С 21 дня интенсивность свечения в различных зонах головного мозга, в том числе в коре головного мозга у крыс обеих линий,

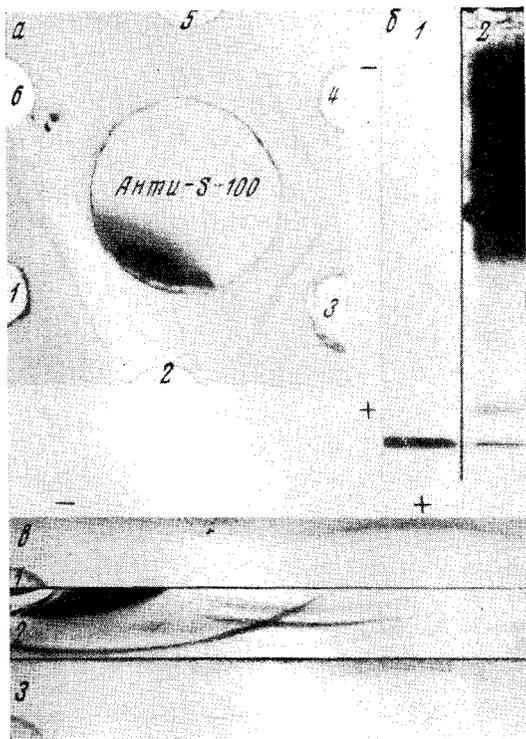


Рис. 1. *a* — контроль органоспецифичности анти-S-100-сыворотки. В центральной лунке анти-S-100-сыворотка. 1 и 4 — S-100-белок, 2 — сыворотка крысы, 3 — экстракт из головного мозга, 5 — суммарный экстракт из гетерологичных органов крысы, 6 — экстракт из печени крысы; *b* — электрофорез в 12% полиакриламидном геле: 1 — S-100-белок; 2 — экстракт из головного мозга крысы; 3 — иммуноэлектрофореграмма проявлена анти-S-100-сывороткой (1) и органоспецифической аптимозговой сывороткой (2); 3 — S-100 белок (проявление анти-S-100-сывороткой)

выравнивается. Имеются литературные данные, свидетельствующие о синтезе S-100-белка в процессе дифференцировки головного мозга (¹³). По нашим данным, иммуноэлектрофоретически белок S-100 впервые обнаруживается в мозге крыс резистентной к звуку линии на 14 день жизни, у чувствительной к звуку линии — на 17 день жизни (²). Как и следовало ожидать, метод Кунса, как более чувствительный, позволил обнаружить начальные стадии накопления белка S-100 в нервной ткани. В соответствии с биохимическими данными (¹⁴), отмечается каудоростральный градиент его появления в онтогенезе, начиная с 5 дня жизни животного. В целом увеличение белка S-100 совпадает по времени с развитием клеточной дифференцировки в головном мозге крысы (¹⁵). Период накопления клеток, положительно реагирующих с анти-S-100-сывороткой в коре головного мозга крысы, как показано в нашей лаборатории И. Ю. Раушенбах, характеризуется также относительно синхронной полиплоидизацией пирамидных нейронов пятого слоя и интенсификацией транспорта РНК из ядра в нейроплазму этих клеток.

По-видимому, полученные результаты свидетельствуют о возможности межлинейных различий в темпах биохимического созревания нервной ткани, что уже отмечали некоторые авторы (¹⁶) и что может лежать в основе формирования межлинейных различий в поведенческих реакциях.

Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Академии наук СССР
Новосибирск

Поступило
28 I 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. М. Свиридов, Е. В. Полякова, ДАН, 187, № 4, 925 (1969). ² С. М. Свиридов, Е. В. Полякова, Л. И. Корочкин, Онтогенез, 1, 5, 463 (1970). ³ В. W. Moore, Biochem. Biophys. Res. Commun., 19, 6, 739 (1965). ⁴ В. W. Moore, V. Peretz, M. Gehring, J. Neurochem., 15, 28, 56 (1968). ⁵ Н. Нуден, В. Мс-Евен, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 55, 354 (1966). ⁶ Л. В. Крушинский, В кн.: Формирование поведения животных в норме и патологии, М., 1960, стр. 123. ⁷ В. С. Цветков, В кн.: Иммунохимический анализ, М., 1968, стр. 120. ⁸ S. Hjerten, S. Ierstedt, A. Tiselius, Anal. Biochem., 27, 108 (1969). ⁹ Г. Дегерман, В кн.: Гель-хроматография, М., 1970, стр. 161. ¹⁰ D. Kessler, L. Levine, S. Fashman, Biochem., 72, 758 (1968). ¹¹ Н. А. Энгельгардт, В кн.: Иммунохимический анализ, М., 1968, стр. 165. ¹² G. Sainte-Marie, J. Histochem. Cytochem., 10, 3, 250 (1962). ¹³ В. W. Moore, In: Handb. of Neurochemistry, 1, 4, 93 (1969). ¹⁴ I. E. Zuckerman, H. R. Herschman, L. Levine, J. Neurochem., 17, 247 (1970). ¹⁵ Л. И. Корочкин, Ю. И. Лоншаков и др., Арх. анат., гистол. и эмбриол., 11, 10, 62 (1966). ¹⁶ I. King, In: Behavior-genetics Analysis, N. Y., 1967.