

УДК 612.822.3+612.017.1

ИММУНОЛОГИЯ

М. Б. ШТАРК, М. В. СТАРОСТИНА, Л. В. ВОСКРЕСЕНСКАЯ, Л. В. ГОРШ
**О ФОРМИРОВАНИИ АНТИГЕННОГО СПЕКТРА В КУЛЬТУРЕ
ПЕРВОЙ ТКАНИ**

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 19 VIII 1974)

Ранее была рассмотрена гипотеза о возможной роли мозгоспецифических антигенов (м.с.а.) в клеточных механизмах памяти, в частности — протерения (⁹, ¹⁰), и предложена «простая клеточная система» — культура центральных нейронов — для экспериментальной проверки этого предположения. В качестве первого этапа такого анализа представлялось необходимым исследовать закономерности формирования антигенного спектра в культуре нервной ткани (к.н.т.), сведения о котором в литературе отсутствуют.

Известно, что в головном мозге истощенная гомологичными органами мозговая антисыворотка идентифицирует 11—12 водорастворимых антигенов, 5 из которых принадлежат к мозгоспецифическим (², ⁶, ⁷, ¹³). У крыс антигенный спектр формируется в постнатальном онтогенезе и окончательно складывается к 30—40 дням (⁷). Представлялось важным сопоставить известные ранее факты о формировании электрической активности к.н.т. и синаптогенезе в ней с динамикой созревания мозгоспецифического антигенного спектра (⁶).

В качестве антигена использовался гомогенат и солевой экстракт мозга крысы (⁶), перфузировавшего сердце забуференным 0,14 N NaCl (рН 7,2). Гомогенат центрифугировался при 16 000 об/мин, осадок ресуспендировался и повторно центрифугировался, надосадочная жидкость лиофильно высушивалась. Истощение сывороток проводилось солевым экстрактом крысиной сыворотки и гомологичных органов, приготовленных сходным образом. Иммуноэлектрофоретически анализировался экстракт мозга, отдиализованный против веронал-мединалового буфера ($\mu=0,1$, рН 8,6), и солевой экстракт к.н.т. различных сроков культивирования. Методика культивирования и морфологического исследования к.н.т. была описана нами ранее (⁸).

Исследовалась культура ткани гиппокампа новорожденных крыс сроками 3,5—7, 10—12, 15—20, 25—30 дней, которая собиралась с 4 покровных стекол и растиралась в 0,1 мл веронал-мединалового буфера ($\mu=0,1$, рН 8,6). Полученный экстракт наносился в лунки.

Титр антисывороток (а.с.), контроль истощения, соответствие антигенов к.н.т. и мозга, а также отсутствие реакции а.с. со средой и коллагеном определялись методом двойной диффузии в агарозном геле. В экспериментах использовались иммунные сыворотки в концентрации 18% (180 мг/мл), титр был равен 1/128—1/256. Для определения белка S-100 ставилась реакция идентичности (⁴).

Для исследования формирования антигенного спектра в к.н.т. был использован вариант высоковольтного иммуноэлектрофореза (¹⁵) в 0,8% агарозном геле на веронал-мединаловом буфере (рН 8,6, $\mu=0,1$), помещенном на предметном стекле (4 мл). Применение высокого градиента потенциала сокращало время опыта и снижало эффект диффузии материала в носитель, которая ограничивает возможность разделения веществ с низким

молекулярным весом. Иммунофореграммы получались обычным способом (3).

Для стандартизации условий эксперимента применяли следующее: а) в каждом из опытов бралась к.п.т. с 4 стекел, содержащих в среднем 4—5 эксплантатов. Количество белка в экстракте определялось по Лоури; экстракт с одного покровного стекла содержит 125 мкг/мл белка (0,5% раствор), что разрешимо для чувствительности метода (38 или 3 мкг/мл); б) постоянство условий разгонки регистрировалось по положению «свидетеля»; в) в опытах использовалась смешанная а.с. от нескольких животных для нейтрализации индивидуальных различий продуцентов антител. Выполнение этих условий позволило считать количество антигена и антител одинаковыми для всех препаратов и изменения антигенного спектра относить к временным особенностям белкового состава к.п.т. Для определения биосинтеза индивидуальных антигенов в ходе развития к.п.т. применялся метод иммуноавторадиографии (4).

Результаты и обсуждение. Иммуоэлектрофорез 6% экстракта мозга 18% а.с. выявлял 10—11 антигенов, подвижность которых, в сравнении с положением белковых фракций пассивной крысиной сыворотки, позволяла разделить их на 4 зоны — преальбуминов (I), альбуминов (II), α - и β -глобулинов (III) и γ -глобулинов (IV). Выявленные компоненты располагались следующим образом: IV — четыре антигена, III — три, II — два, I — один-два, что совпадает с результатами (2, 6, 13). Источенная а.с. проявляет 4—5 антигенов, соответственно в зоне I—1, II—2, III—1—2 (рис. 1А см. вкл. к стр. 1237).

Методом двойной диффузии по Ouchterlony сравнивались между собой антигены к.п.т. и целого мозга. Оказалось, что в к.п.т. присутствует лишь часть антигенов (рис. 1Б). Антигенов к.п.т., отличных от антигенов целого мозга, обнаружено не было. Так как в экстракте к.п.т. отсутствовали медленно диффундирующие антигены «внешней зоны», можно предположить, что это антигены сыворотки, отсутствовавшие в «клеточной системе». А.с. не давали реакции на среду культивирования и коллаген, которым покрыты покровные стекла.

В ранние сроки культивирования органоспецифические антигены в к.п.т. отсутствуют. На 5—7 сутки можно видеть следы специфического антигена в зоне III. На 10—12 день появляются три антигена в этой же зоне, один во II и один между II и III (рис. 1В). Таким образом, как и в целом мозге, в первую очередь появляются антигены с низкой электрофоретической подвижностью, затем с высокой. Быстрое нарастание числа антигенов, в том числе и мозгоспецифических, на 10—12 день культивирования уместно сопоставить с окончанием морфологической дифференцировки, активным синаптогенезом и формированием электрической активности в эти сроки (8, 12, 14). А.с. к белку S-100* в 12% концентрации давала единственную дугу преципитации с 6 и 2% экстрактом мозга на 15 день культивирования (рис. 1Д), что совпадает с завершением миелинизации, т. е. формированием олигодендроглии (11, 12).

С помощью иммуноавторадиографии было показано, что интенсивность включения C^{14} -гидролизата в антигены к.п.т. не одинакова в разные сроки культивирования (рис. 2Б см. вкл. к стр. 1237). Это свидетельствует о временной разобщенности синтеза антигенов в к.п.т. Интенсификация синтеза и появление новых антигенов после 10—12 дня хорошо согласуется с данными об окончании морфологической и функциональной дифференцировки в к.п.т. этого срока. Основываясь на динамике синтеза антигена, занимающего I и II зоны (отсутствие его в к.п.т. ранних сроков, появление на 10—12 день, нарастание к 20 дню, усиленный синтез до 25—30 дня), воз-

* Была использована а.с. к S-100, полученная от проф. Л. Левина (Department of Biochem., Brandeis University, Massachusetts, USA), которому авторы сердечно признательны.

можно предположить, что он является глиальным белком, связанным с миелинизацией в к.н.т.

Таким образом, в к.н.т., как и в целом мозге, формируется антигенный спектр, специфичный для нервной ткани, что может свидетельствовать о сохранении основных характеристик белкового обмена *in vitro*. Сроки формирования этого спектра коррелируют с процессами функциональной и морфологической дифференцировки, синаптогенезом и появлением электрической активности. Эти факты позволяют сформулировать несколько принципиально новых задач для решения вопросов о физиологической роли м.с.а. (зависимости их синтеза от медиаторных систем мозга, закономерности индукции его, локализация м.с.а. при разных функциональных состояниях нейрона и др.), решение которых имеет принципиальное значение для анализа механизмов функционирования мозга.

Авторы выражают благодарность С. М. Свиридову за помощь в работе.

Институт автоматки и электротрии
Сибирского отделения
академии наук СССР

Поступило
14 VIII 1974

Институт клинической и
экспериментальной медицины
Сибирского филиала
Академии медицинских наук СССР
Новосибирск

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. И. Абилов, В кн. Иммунохимический анализ, М., 1968. ² Э. С. Гершеневич, А. А. Силичкин, Л. М. Румбешт, ДАН, т. 186, № 2, 474 (1969). ³ П. Грабар, П. Буртен, Иммуноэлектрофоретический анализ, ИЛ, 1963. ⁴ А. С. Гусев, В кн.: Иммунохимический анализ, М., 1968. ⁵ Л. Б. Забжицкая, Л. З. Шевнер, ДАН, т. 210, № 3, 737 (1973). ⁶ К. И. Кашкин, Л. Н. Шарецкий и др., Вопр. мед. химии, т. 15, 3, 27 (1969). ⁷ С. М. Свиридов, Е. В. Полякова, ДАН, т. 187, № 4, 925 (1969). ⁸ М. Б. Штарк, Л. В. Воскресенская и др., ДАН, т. 202, № 3, 734 (1972). ⁹ М. Б. Штарк, В. Г. Колпаков, Тез. докл. V Всесоюз. конфер. по нейроцибернетике, Ростов-на Дону, 1973, стр. 347. ¹⁰ М. Б. Штарк, В. Г. Колпаков, Б. Б. Фукс, Усп. соврем. биол., т. 77, 4/1, 71 (1974). ¹¹ С. D. Allerand, M. R. Murrey, Arch. Neurobiol., v. 40, 292 (1968). ¹² S. U. Kim, Exp. Neurol., v. 41, 150, 162 (1973). ¹³ E. Kosinski, P. Grabar, J. Neurochim., v. 14, 3, 273 (1967). ¹⁴ J. H. La Vail, N. K. Wolf, Am. J. Anal., v. 137, 1, 47, 66 (1973). ¹⁵ P. J. Wiemme, Techniques Applications, Brussel, 1959.