

СТЕПУШКИНА О. Г., НОВОЖИЛОВА О. С.
ВЛИЯНИЕ АТФ НА БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ
НЕРВНОГО ВОЛОКНА В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ

Аннотация. Проведено исследование влияния АТФ на белковый состав миелиновой фракции и фракции осевых цилиндров (аксонов) периферического нерва при повреждении. Установлена зависимость белкового состава при введении АТФ. Наличие выявленных белков указывает на процесс регенерации нерва, а увеличение их концентрации – на действие АТФ на процессы синтеза белков.

Ключевые слова: нервное волокно, миелин, аксон, глия, белки, АТФ, повреждение, регенерация.

СТЕПОШКИНА О. Г., NOVOZHILOVA O. S.
EFFECT OF ATP ON PROTEIN COMPOSITION
OF NERVOUS FIBER DURING REGENERATION

Abstract. The effect of ATP on the protein composition of the peripheral nerve myelin and axon fractions in case of damage was investigated. The dependence of the qualitative protein composition affected by the administration of ATP was found out. The presence of the proteins indicates the process of nerve regeneration and an increase in their concentration shows the effect of ATP on the protein synthesis processes.

Keywords: nerve fiber, myelin, axon, glia, proteins, ATP, damage, regeneration.

В последнее время одной из первостепенных задач неврологии является исследование заболеваний периферической нервной системы. Регенерация периферических нервов, восстановление функций поврежденных тканей и органов имеет немалый клинический интерес [2].

В регенерации нерва, в частности аксона, непосредственное участие принимают шванновские клетки [3]. После повреждения травмированные нейроны должны перейти от режима передачи к режиму роста и начать продуцировать белки, имеющие потенциал для стимуляции регенерации [10]. При повреждении нерва АТФ быстро высвобождается, что способствует активации ряда сигнальных путей, которые приводят к активации клеток глии и к восстановлению функций нерва [9]. Так же АТФ участвует в активации лизосомального экзоцитоза, способствующего последующей активной регенерации нерва [10; 11]. Высокая концентрация внеклеточного АТФ ингибирует деградацию аксонов [11].

Целью исследования является изучение влияния АТФ на белковый состав периферического нерва в процессе регенерации.

Материал и методы исследования. Объектом исследования служили белые крысы линии Wistar обоего пола, массой 200–250 г в возрасте 3–4 месяцев. Животные содержались на стандартном рационе питания, в условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Материалом исследования служили седалищные нервы. Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с «Правилами проведения работы с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13.11.1984 г. № 724). Животные были разделены на группы: контрольная группа; группа животных с перерезанным седалищным нервом, которые выводились из эксперимента через 1, 7 и 30 суток. Также животные с перерезанным седалищным нервом делились на группы, которым вводились инъекции АТФ (в концентрации 0,5 мг/кг) и животные без инъекций.

У крыс под действием хлороформного наркоза препарировали седалищный нерв на уровне средней трети бедра и перерезали его ножницами. Рану обрабатывали спиртом и зашивали. При извлечении материала животных усыпляли парами хлороформа. Выделенные нервы помещали в раствор Рингера, проводили гомогенизацию нервного волокна, в гомогенате определяли общее содержание белка методом Лоури [8]. Гомогенат разделяли на две фракции: миелиновая и осевые цилиндры [4] и проводили электрофоретическое разделение белков в ПААГе после делипидизации [6].

Результаты и их обсуждение. Установлено, что концентрация белков миелина под действием АТФ незначительно снижалась в течение 7 суток, на 30-е сутки после перерезки нерва концентрация белка увеличивалась на 21% по сравнению с контролем, что соответствует данным, полученным Морозовой А. А. [1]. Похожая картина наблюдалась во фракции осевых цилиндров: на 7-е сутки значительных изменений не наблюдалось, на 30-е сутки концентрация увеличилась на 8% по сравнению с контролем.

Полученные данные указывают на регенеративные процессы в нервном волокне. Максимальной активности они достигают к 4-й неделе после повреждения. Образуются бунгеровы ленты, состоящие из колоний шванновских клеток, участвующих в регенеративном процессе [2]. Под действием АТФ шванновские клетки активно делятся, образуя бунгеровы ленты и культуру [9].

Электрофоретическое разделение белков миелиновой фракции седалищного нерва животных, которым вводился АТФ в течение 1, 7 и 30 суток, показало наличие в ней следующих миелин-специфических белков: MAG – миелин-ассоциированный белок; CNP – циклическая нуклеотидфосфодиэстераза; PLP – протеолипидный белок; P0 – нулевой белок; PMP22 – периферический миелиновый белок 22; MBP – основной белок миелина; липофилин (рисунок 1).

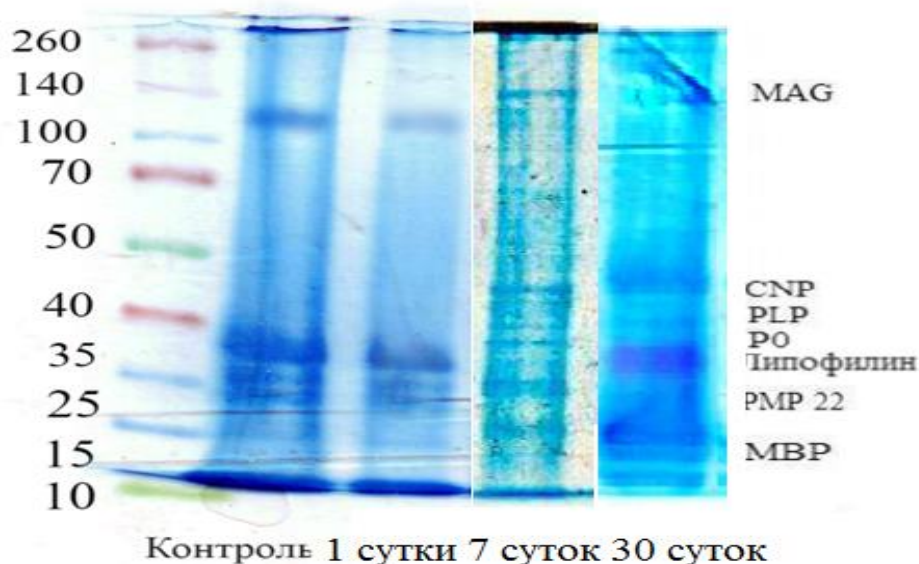


Рис. 1. Электрофореграмма миелин-специфических белков при перерезке нерва и после введения АТФ в течение 1, 7 и 30 суток.

При разделении белков миелиновой фракции опытных образцов после введения препарата через сутки на электрофореграмме были обнаружены те же белки, что и в контроле. Интенсивность полос ниже в сравнении с контрольной группой, что говорит о понижении концентрации белков.

При разделении белков миелиновой фракции опытных образцов после введения АТФ в течение 7 суток были обнаружены те же белки, что и в контроле. Стали видны 2 белка, связанные с регенерацией нервного волокна – P0 и RMP22. При введении АТФ их интенсивность увеличивалась в сравнении с образцами без введения вещества, что указывает на увеличение концентрации белков.

Через 30 суток после введения АТФ новые белки не обнаружены. Интенсивность белковых полос значительно увеличивалась по сравнению с контролем и данными, полученными через 7 суток и через сутки после перерезки, что говорит об увеличении в нерве содержания миелин-специфических белков, участвующих в процессах регенерации нервного волокна. Полученные данные согласуются с данными Seballos D. et. al., согласно которым увеличение уровня миелин-специфических белков способствует процессам регенерации [5].

При электрофорезе белков фракции осевых цилиндров после введения АТФ в течение суток были обнаружены следующие белки: GAP-43, GP 350, тубулин, периферин, PGP 9.5, нейрофиламенты и SCG10 (рисунок 2).

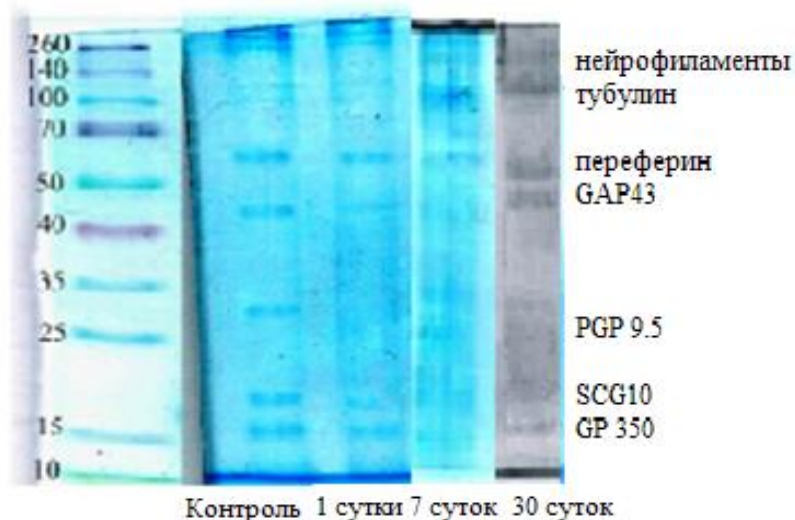


Рис. 2. Электрофореграмма белков фракции осевых цилиндров при перерезке нерва и после введения АТФ в течение 1, 7 и 30 суток.

Интенсивность полос опытных образцов в сравнении с контролем стала ниже, что говорит о снижении концентрации белков осевых цилиндров.

Интенсивность белковых полос осевых цилиндров снижалась в сравнении с контролем в течение первых суток. На 7-е сутки интенсивность полос также снижалась по сравнению с контролем, новые белки не идентифицированы.

На электрофореграмме опытных образцов после повреждения через 30 суток видны те же белки фракции осевых цилиндров, что и в контроле, но полосы более интенсивные, что говорит об увеличении концентрации данных белков, необходимых в процессе регенерации. Белки P0, PMP играют непосредственную роль в регенерации нервного волокна [1]. Изменений в качественном составе белков под действием АТФ отмечено не было.

В ходе проведения электрофореза было замечено, что в образцах проксимальной части нерва интенсивность полос уменьшалась в течение первой недели, к 30 суткам интенсивность полос увеличивалась в сравнении с контролем или же становилась такой же интенсивности. У опытной группы животных, которой вводили препарат АТФ, также было замечено, что в течение первой недели интенсивность белковых полос снижалась в сравнении с контролем, но по сравнению с опытными образцами полосы более интенсивные. К 30 суткам полосы по интенсивности превосходили и контроль, и опытные образцы без АТФ.

В процессе регенерации нервного волокна задействованы различные белки. Некоторые из них были зарегистрированы как в миелиновой фракции, так и во фракции осевых цилиндров. Белки миелиновой фракции: GAP-43 – белок, участвующий в регенерации аксона [1]; PGP 9.5 является маркером регенерации; P0, формирующий миелин;

РМР22. Белки фракции осевых цилиндров: CNРаза, инициирующая сборку микротрубочек [7]; ПМБ 2, стабилизирующий мембраны миелина [1]; периферин; SCG10, запускающий процесс регенерации. Наличие данных белков указывает на процесс регенерации, а увеличение их концентрации – на действие АТФ в процессах их синтеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозова А. А., Пиняев С. И., Ревина Э. С. Особенности белкового состава миелиновой оболочки и осевых цилиндров аксонов периферического нерва в норме и при повреждении // XLIV Огаревские чтения. – 2016. – Т. 2. – С. 206–211.
2. Поражения периферических нервов и корешковые синдромы / под ред. Мументалера М., Штёра М., Мюллер-Фаля Г.; пер. с нем.; под общ. ред. А. Н. Баринова. – М.: МЕДпресс-информ, 2013. – 616 с.
3. Обухов Д. К., Сотников О. С., Кругляков П. П. Радиальная глия как источник новых нейронов / под ред. Р. К. Данилова. – СПб: СпецЛит., 2011. – С. 491–674.
4. Чехонин В. П., Гурина О. И., Дмитриева Т. Б. Основной белок миелина // Вопросы мед. химии. – 2006. – Т. 46, № 6. – С. 549–563.
5. Ceballos D., Cuadras J., Verdu E. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve // J. Anat. – 1999. – № 195. – pp. 563–576.
6. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage // Nature. – 2000. – Vol. 4. – pp. 680–685.
7. Lee J., Gravel M., Zhang R., Thibault P. Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein// J. Cell Biol. – 2005. – Vol. 170. – pp. 661–673.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – pp. 265–275.
9. Negro S., Rodella U. ATP Released by Injured Neurons Activates Schwann Cells // Front Cell Neurosci. – 2016. – Vol. 10. – pp. 1–6.
10. Sawada K., Echigo N., Juge N. Identification of a vesicular nucleotide transporter // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – Vol. 105, № 15. – pp. 5683–5686.
11. Shin Y. H., Chung H. J., Park C. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) inhibits schwann cell demyelination during Wallerian degeneration // Cellular and Molecular Neurobiology. – 2014. – Vol. 34, № 3. – pp. 361–368.