

УДК 599.322:001.85.612.82

К ВОПРОСУ О СПЕЦИФИЧНОСТИ БЕЛКА S-100 В ПРОЦЕССАХ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ

АЛЕКСИДЗЕ Н. Г., БЕРЕЖНОЙ Г. А., НИКУРАДЗЕ В. О., БЕЛИК Я. В.

Методами иммунохимии и системного анализа изучено распределение нейроспецифического белка S-100 в коре больших полушарий, гиппокампе и мозжечке в экспериментах по обучению крыс использовать непередпочитаемую лапу для добычи пищи. Сделано заключение, что синтез белка S-100 в процессе обучения является ответной реакцией нервных клеток специфических структур мозга, участвующих в формировании памяти и новой поведенческой реакции, и не имеет сигнального значения.

Изучение обмена нейроспецифического белка S-100 в головном мозгу представляет большой интерес в связи с его возможной ролью в механизмах обучения и памяти. Белок S-100 является главным белком, однако его находят в плазматических мембранах, ядрах нейронов и нервных окончаниях [1—4]. Региональный характер содержания белка S-100 в нервной клетке послужил основанием для экспериментального обоснования его участия в работе генетического аппарата и синаптической активности [5, 6].

Известно, что обучение крыс использовать непередпочитаемую лапу для добычи пищи сопровождается повышением содержания белка S-100 в пирамидных нейронах поля CA₃ гиппокампа [7, 8]. Содержание белка S-100 измеряли в момент закрепления нового поведенческого навыка (5-й день обучения) и на 14-й день тренировки. Было установлено, что введение антисыворотки против белка S-100 обратимо ухудшает способность крыс к обучению [7]. В данной работе не проводился комплексный корреляционный анализ в динамике. Изучение содержания белка S-100 в гиппокампе и таламусе за 25 мин после начала обучения крыс использовать непередпочитаемую лапу для добычи пищи на фоне внутрижелудочкового введения антисыворотки, абсорбированной белком S-100, и антисыворотки против белка S-100 также не позволило выявить закономерную корреляцию между синтезом белка S-100 и способностью крыс к обучению [8].

Таким образом выясняется, что из-за отсутствия данных системного анализа в динамике вопрос о специфичности белка S-100 в процессах обучения остается открытым. Нами была предпринята попытка биохимического обоснования возможной роли белка S-100 в процессах обучения животных новому поведенческому навыку использовать не-

предпочитаемую лапу для добычи пищи с помощью иммунохимических приемов и системного анализа в динамике.

Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс массой 120—150 г. Обучение крыс проводили по описанному ранее методу [9]. Крыс обучали использованию непредпочитаемой лапы для добычи пищи из узкой пробирки на фоне внутрижелудочкового введения антисыворотки против белка S-100 и антисыворотки против белка S-100, абсорбированной антигеном S-100, и физиологического раствора. Антисыворотку к белку S-100 перед введением концентрировали с помощью сухого сефадекса G-25 в два раза. Испытуемые вещества вводили в желудочки мозга билатерально в объеме 10 мкл на 3—4-й день после начала обучения. Память оценивали количеством правильных ответов (использование непредпочитаемой лапы) из 25 испытаний. Тренировку проводили в день два раза (по 25 испытаний) в течение 11 дней. После каждой двухдневной тренировки определяли количество белка S-100 в ипси- и контралатеральной коре больших полушарий мозга, гиппокампе и мозжечке. Ткань мозга после замораживания и последующего оттаивания в жидком азоте гомогенизировали в 0,0125 М вероналовом буфере (pH 8,6) с тритоном X-100 (0,1%). Гомогенат центрифугировали при 45000 g 30 мин, и в супернатанте количественно определяли содержание белка S-100 методом радиальной иммунодиффузии в агаровом геле по прописи Mancini и соавт. [10]. Количество белка S-100 выражали в процентах от суммарного количества растворимых белков исследуемых структур мозга. Белок S-100 препаративно выделяли из мозга быка по методу [11] с некоторой модификацией, заменив последнюю стадию очистки препаративным диск-электрофорезом в 10% полиакриламидном геле [12]. В дальнейшем готовили моноспецифическую антисыворотку к белку S-100 путем гипериммунизации кроликов. Белок S-100 вводили подкожно с полным адьювантом Фрейнда. Полученную антисыворотку хранили в замороженном состоянии до применения в эксперименте.

Абсорбированную антисыворотку готовили следующим образом: к антисыворотке против белка S-100 добавляли антиген-белок S-100 и инкубировали при 37° в течение 1 ч. Смесь оставляли в холодильнике на 24 ч и центрифугировали при 45000 g 45 мин.

Результаты исследований

В первой серии опытов исследовали влияние внутрижелудочкового билатерального введения физиологического раствора, антисыворотки против белка S-100, абсорбированной белком S-100, и антисыворотки против белка S-100 на скорость обучения крыс использовать непредпочитаемую лапу для добычи пищи. Как видно из рис. 1, результаты правильных ответов животных после введения физиологического раство-

ра или антисыворотки против белка S-100, абсорбированной белком S-100, практически не отличались. На 4—5-й день уровень обучаемости достигал максимума, и новая поведенческая реакция сохранялась в течение длительного времени. После введения антисыворотки против S-100 ход кривой обучения заметно изменялся. На второй день после введения антисыворотки против белка S-100 (третий день обучения) память крыс на новое поведение полностью стиралась, и их реакция на добычу пищи унедоблялась поведению необученных крыс. В последующие три дня обучение протекало с некоторой задержкой, в результате чего в отличие от опытов с введением абсорбированной антисыворотки против белка S-100 и физиологического раствора динамика обучения растягивалась во времени. С 7-го дня тренировки наклон кривой обучения находился в полном соответствии с наклоном кривой обучаемости контрольных животных и лишь на 11-й день тренировки достигал 80—85% критерия.

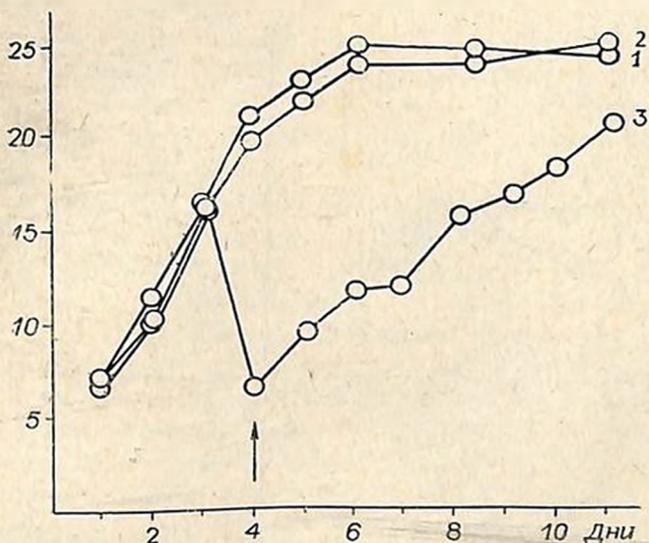


Рис. 1. Влияние внутрижелудочкового введения физиологического раствора (1), абсорбированной антисыворотки против белка S-100 (2) и антисыворотки против белка S-100 (3) на обучение крыс использовать непредпочитаемую лапу для добычи пищи. На ординате—количество правильных ответов; стрелки показывают момент введения испытуемых веществ

Во второй серии опытов в описанных выше условиях обучения крыс доставать пищу непредпочитаемой лапой в ипсил- и контрлатеральной коре больших полушарий, гиппокампе и мозжечке исследовали изменение количественного содержания белка S-100 методом радиальной иммунодиффузии. Как видно из рис. 2, в процессе обучения крыс использовать непредпочитаемую лапу на фоне внутрижелудочкового введения физиологического раствора в контрлатеральных обла-

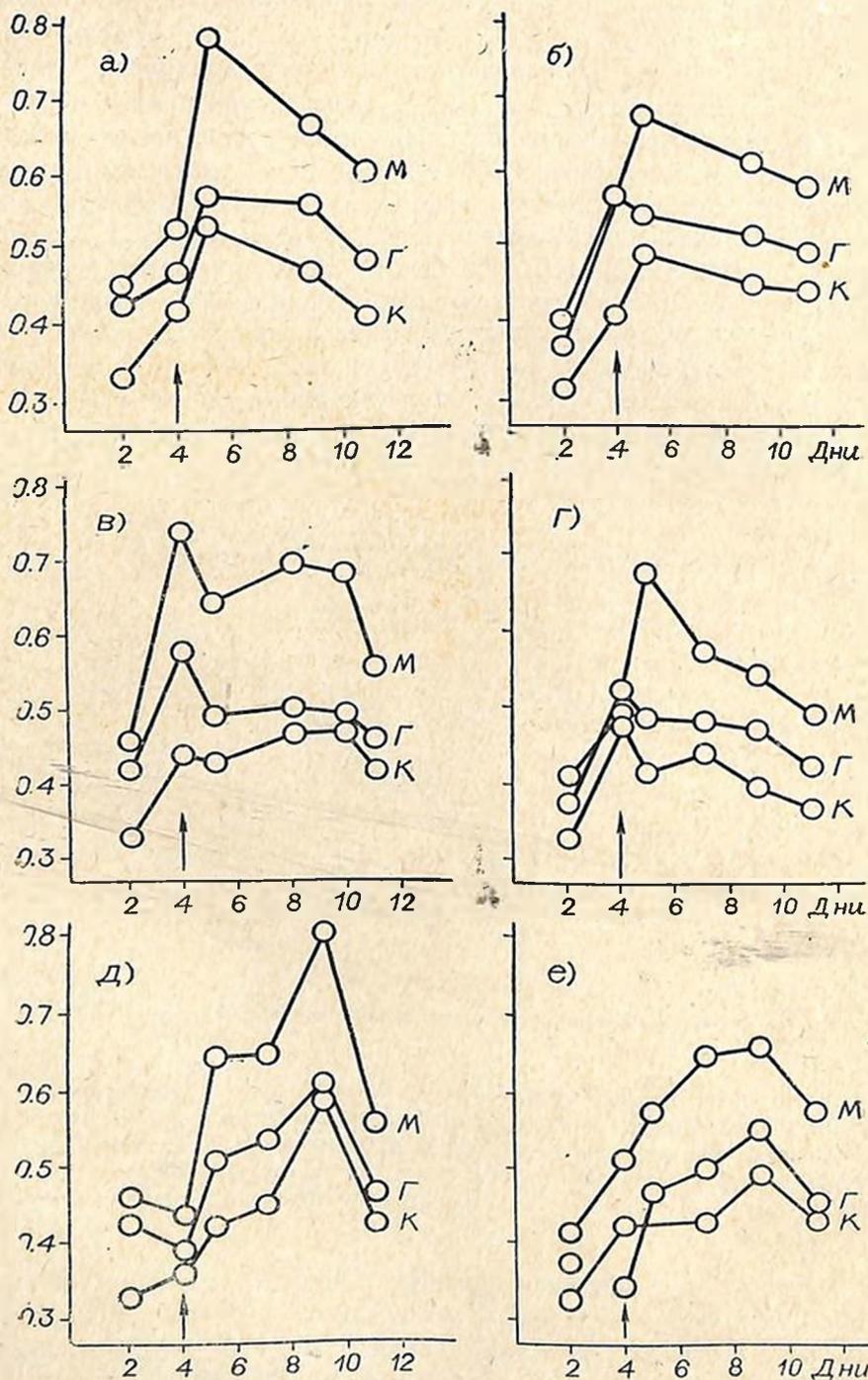


Рис. 2. Влияние внутрижелудочкового введения физиологического раствора (а, б), абсорбированной антисыворотки против белка S-100 (в, г) и антисыворотки против белка S-100 (д, е) на содержание белка S-100 в ипси- (б, г, е) и контрлатеральной (а, в, д) коре больших полушарий (К), гиппокампе (Г) и мозжечке (М). На ординате—количество белка S-100 в процентах растворимых белков коры, гиппокампа и мозжечка. стрелки показывают момент введения испытуемых веществ

стях во всех изученных нами структурах мозга содержание белка S-100 возрастало (рис. 2, а). Максимальное содержание белка обнаружилось на 4—5-й день обучения, что коррелирует с закреплением новой поведенческой реакции. В последующие дни, несмотря на продолжающееся добывание пищи непригодной лапой, количество белка S-100 постепенно уменьшалось и приближалось к исходному уровню. В ипсилатеральной коре, гиппокампе и мозжечке обнаруживалась аналогичная закономерность, но без четко выраженных количественных переходов.

Результаты опытов с абсорбированной антисывороткой против белка S-100 практически не отличались от результатов опытов с физиологическим раствором. В этом случае память крыс на выработанный поведенческий навык четко коррелировала с усилением синтеза белка S-100. На 4-й день после начала тренировки содержание белка S-100 в мозжечке возрастало от 0,46 до 0,74% от суммарных растворимых белков, что в среднем составило повышение на 61%. Меньшие сдвиги в изменении содержания белка S-100 были обнаружены в гиппокампе (+25—30%) и в коре больших полушарий (+20%). Однако по скорости нормализации содержания белка S-100 была выявлена тенденция в обратной последовательности. В этой связи ипсилатеральные структуры мозга отличались от контрлатеральных.

Резко отличалась динамика содержания белка S-100 в исследованных структурах мозга при внутрижелудочковом введении антисыворотки против белка S-100 на фоне обучения. После введения антисыворотки против белка S-100 в гиппокампе и мозжечке вначале происходило частичное уменьшение, а затем увеличение содержания белка S-100, максимальное накопление которого отодвигалось во времени и достигало максимума на 9-й день после начала обучения, когда уровень обучаемости составлял примерно 70% критерия. В аналогичных условиях опытов не удавалось наблюдать четких количественных переходов в содержании белка S-100 в ипсилатеральной коре больших полушарий мозга, гиппокампе и мозжечке, но закономерность динамики в содержании белка S-100 не менялась. Например, если количество белка S-100 в контрлатеральном мозжечке на 9-й день тренировки животных достигало примерно 0,8%, что превосходило контрольный уровень более чем в 1,8 раза, то в ипсилатеральном этот показатель изменялся примерно в такой же степени (1,6 раза), но с более плавным переходом. Аналогичная закономерность была обнаружена в динамике обмена белков как в ипси-, так и в контрлатеральном гиппокампе и коре больших полушарий.

Обсуждение результатов

Была предпринята попытка биохимического обоснования возможной специфической связи механизмов памяти с биосинтезом белка S-100 в ипси- и контрлатеральной коре больших полушарий, гиппокампе и мозжечке головного мозга в процессе обучения крыс использовать не-

предпочитаемую лапу для добычи пищи. При решении этого вопроса мы использовали моноспецифическую антисыворотку против белка S-100 с целью исключения последнего из общего белкового метаболизма. Контролем служили животные, предварительно обработанные физиологическим раствором или абсорбированной антисывороткой против белка S-100.

Было установлено, что физиологический раствор и абсорбированная антисыворотка не влияли на скорость обучения крыс использовать непредпочитаемую лапу для добычи пищи. Результаты соответствовали данным опытов, проведенных ранее другими авторами [7, 9]. Введение антисыворотки против белка S-100 нарушало скорость обучения в течение 2—3 дней, а в последующие дни обучение проходило нормально.

Создается впечатление, что латентный период необходим для индукции синтеза белка S-100, т. е. для восстановления такого уровня в его содержании, который, по-видимому, обеспечивает нормальное течение нейродинамических процессов, лежащих в основе ответных реакций головного мозга на функциональную нагрузку. Результаты количественного определения содержания белка S-100 в разных структурах мозга в период обучения показали положительную корреляцию уровня обучаемости животных и содержания белка S-100 в коре больших полушарий, гиппокампе и мозжечке (рис. 2). Корреляция выявилась в совпадении становления новой поведенческой реакции и максимального содержания белка S-100 во всех изученных структурах мозга как в контрольных опытах, так и в условиях внутрижелудочкового введения антисыворотки против белка S-100. Например, в опытах с физиологическим раствором или абсорбированной антисывороткой на 4—5-й день заканчивалось обучение, максимальное содержание количества белка S-100 также обнаруживалось на 4—5-й день обучения. В опытах же с антисывороткой против белка S-100 пик индукции синтеза белка S-100 достигал максимума на 9-й день, когда уровень обучаемости составлял 70—80% критерия. Привлекает внимание тот факт, что после введения антисыворотки против белка S-100 незначительно уменьшалось количество этого белка. Следовательно, можно предположить, что отрицательный эффект введения антисыворотки в большей степени обусловлен взаимодействием с *de novo* синтезированным белком S-100, хотя не исключено отрицательное влияние на память конъюгата белка S-100, как это было продемонстрировано на примере пептидил-пуроминина [13]. Если учесть данные литературы об участии белка S-100 в регуляции действия генетического аппарата и активности синапсов [5, 6], можно предположить наличие двух точек приложения отрицательного влияния антисыворотки против белка S-100 на память: на уровне генетического аппарата и синаптической передачи. Оба уровня играют важную роль в процессах формирования долговременной памяти [14]. Но из-за отсутствия соответствующих экспериментальных данных пока трудно сделать какие-либо выводы относительно специфиче-

ского направленного действия белка S-100 на обучение и память. Гипотеза Hyden [6], основывавшаяся на принципах конкурентного взаимодействия белка S-100 и актиноподобного белка филаментов постсинаптических мембран с Ca^{2+} , также не говорила в пользу специфической связи сдвигов в содержании белка S-100 с механизмами памяти. Исходя из данных Peterson, Devine [15] и Hyden, Lange [16], за обучение крыс использовать неpreferred лапу для добычи пищи преимущественно ответственными являлись двигательная область коры больших полушарий (2,7 мм латерально и 1,6 мм рострально от брегмы) и гиппокамп (пирамидные нейроны поля CA₃), индукция синтеза белка S-100 в мозжечке трудно объяснима. Однако, учитывая роль мозжечка в целенаправленных двигательных реакциях, усиление синтеза белка S-100 в мозжечке как результат неспецифического ответа на физиологическую нагрузку становится более понятным.

Таким образом, полученные результаты, а также данные литературы о роли белка S-100 в модуляции синаптической активности [6] и об усилении синтеза белка S-100 в мозгу у активных контрольных крыс [17], указывают на то, что синтез белка S-100 в процессе обучения является ответной реакцией на физиологическую нагрузку нервных клеток специфических структур мозга, участвующих в формировании нового поведенческого навыка, который не имеет сигнального значения.

ON THE SPECIFICITY OF S-100 PROTEIN IN LEARNING PROCESS AND MEMORY

ALEKSIDZE N. G., BEREZHINYI H. A., NIKURADZE V. O., BELIK Y. V.

State University, Tbilisi and Institute of Biochemistry,
Ukrainian SSR Academy of Sciences, Kiev

The time related changes in neurospecific protein S-100 content in the courses of learning process has been studied in rat cerebral hemispheres cortex, hippocampus and cerebellum by means of immunochemical methods and systematic analysis.

It is concluded that protein S-100 synthesis in the course of learning process is the response of brain specific structures involved in the formation of a new behaviour pattern and that it does not bear signal meaning.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cicero T. J., Cowan W. M., Moore B. W., Sontzeff V. Brain Res., 13, 25—34, 1970.
2. Haglid K. G., Hamberger A., Hansson H. A., Hydén H., Persson L., Rönnbäck L. Nature (London), 251, 532—534, 1974.
3. Hansson H. A., Hydén H., Rönnbäck L. Brain Res., 93, 349—352, 1975.
4. Hydén H., Rönnbäck L. Neurobiology, 5, 291—302, 1975.
5. Michetti F., De Renzi G., Dorato R., Miant N. Brain Res., 105, 372—375, 1976.
6. Hydén H. Proc. Nat. Sci. USA, 71, 2965—2968, 1974.
7. Hydén H., Lange P. W. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 67, 1959—1966, 1970.
8. Hydén H. Biosci. Commun., 4, 185—204, 1978.

9. *Алексидзе Н. Г., Балавадзе М. В.* ДАН СССР, 148, 1455—1457, 1971.
10. *Manchini G., Carbonara A., Heremas J.* Immunochemistry, 2, 1, 235—254, 1965.
11. *Stewart J. A.* Biochem. Biophys. Acta, 263, 178—192, 1972.
12. *Бережной Г. А.* Укр. биохим. ж., 50, 1, 116—120, 1978.
13. *Flexner L. B., Flexner J. B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 60, 923—935, 1968.
14. *Кометиани П. А., Алексидзе Н. Г., Клейн Е. Э.* Нейрохимические аспекты памяти (под ред. Р. И. Кругликова), Тбилиси, Мешинереба, 1980.
15. *Peterson G. M., Devine J. V. J.* Comp. Biochem. Psychol., 56, 752—758, 1963.
16. *Hydén H., Lange P. W.* Science, 159, 1370—1373, 1968.
17. *Алексидзе Н. Г., Мешвелишвили Д. Ф.* Сообщ. АН ГССР, 59, 185—187, 1970.

Тбилисский государственный
университет, Институт биохимии
АН УССР, Киев

Поступила 14. X 1981