

УДК 612.822.1

ВЛИЯНИЕ ОБУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ КИСЛОЙ И ЩЕЛОЧНОЙ РИБОНУКЛЕАЗ И ИНГИБИТОРА ПОСЛЕДНЕЙ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

НЕЧАЕВА Г. А., ЛОПАТИНА Н. Г.

Выработка условного оборонительного рефлекса у крыс путем последовательного или массированного обучения вызывала увеличение (по сравнению с псевдообученными животными) активности кислой РНКазы в синаптической фракции больших полушарий головного мозга. У обученных животных в растворимой клеточной фракции увеличивалось также содержание неактивных комплексов щелочной РНКазы с ее специфическим белковым ингибитором. Массированное обучение и псевдообучение приводили к уменьшению активности свободного ингибитора в цитозоле.

Участие белков и метаболически тесно связанных с ними рибонуклеиновых кислот в специфической деятельности головного мозга привлекает внимание к изучению ферментов, участвующих в метаболизме РНК, в частности рибонуклеаз. В ткани мозга имеются две отличающиеся по оптимуму активности РНКазы—кислая и щелочная. Предыдущие исследования [1—4] показали, что при выработке условного оборонительного рефлекса у крыс активность этих фракций РНКаз и ингибитора щелочной РНКазы в коре больших полушарий головного мозга изменяется.

В связи с этим возникла необходимость выяснить, обусловлены ли эти сдвиги активности РНКаз эффектом обучения или они возникают под влиянием неспецифической стимуляции, сопровождающей выработку условного оборонительного рефлекса.

С этой целью в настоящей работе исследовали активность кислой РНКазы лизосомной и синаптической фракций и щелочной РНКазы и ее специфического эндогенного белкового ингибитора в растворимой клеточной фракции больших полушарий головного мозга у крыс, которых подвергали выработке условного оборонительного рефлекса, а для контроля также у псевдообученных животных и у животных в состоянии относительного покоя. При этом сопоставлены результаты 1- и 5-дневной схем тренировки.

Материалы и методы

Исследование было проведено на крысах-самцах линии Вистар массой 180—200 г. У части крыс выработку условного оборонительного

рефлекса осуществляли в течение 5 дней во время 5 сеансов с промежутком в 24 ч; в каждом сеансе с интервалом в 30 с применяли по 20 сочетаний условного раздражителя (свет) с безусловным (электрический ток силой 1,5 А). Другую группу животных обучали в течение 1 дня. При таком «массированном» обучении животные получали все 100 сочетаний за один сеанс (общая продолжительность—1 ч) с теми же интервалами между раздражителями, что и при 5-дневном обучении. В каждом случае исследовали 3 группы крыс: подопытную—животных, подвергнутых выработке условного оборонительного рефлекса; группу так называемого активного контроля—псевдообученных животных, которым предъявляли несочетанные раздражители по 1-или 5-дневной схеме тренировки, и интактных животных—так называемый пассивный контроль. Через 30 мин после окончания опыта крыс быстро декапитировали в холодной камере и извлекали головной мозг. Одновременно с подопытными забивали двух контрольных животных—интактное и псевдообученное. Из больших полушарий головного мозга готовили гомогенаты (1:10) и получали из них обогащенные лизосомами фракции (ОЛФ) [3]. Из осадка ОЛФ центрифугированием в градиенте плотности сахарозы выделяли [3, 5] синаптосомную (СФ) и очищенную лизосомную фракции (ЛФ), которые использовали для определения активности кислой РНКазы. Суммарную активность кислой РНКазы определяли после добавления детергента—тритона X-100 (0,1%), освобождающего все количество РНКазы.

Надосадочную фракцию, полученную после отделения осадка ОЛФ, подвергали дополнительному центрифугированию в течение 1 ч при 12 000 g, либо 100 000 g; после этого ее использовали для определения щелочной РНКазы и специфического белкового ингибитора этого фермента, как описано ранее [6]. Щелочная РНКазы в растворимой клеточной фракции головного мозга находится почти полностью в неактивном состоянии, будучи связанной со специфическим белковым ингибитором. Суммарную активность этого фермента определяли после воздействия 1×10^{-4} М раствора п-хлормеркурибензоата п-ХМБ); последний инактивирует ингибитор и переводит латентную щелочную РНКазу в активное состояние.

В растворимой фракции значительная часть белкового ингибитора находится в свободном, не связанном с РНКазой состоянии. Свободный ингибитор способен тормозить активность добавляемой извне РНКазы [6], его активность определяли по торможению активности добавляемой к надосадочной фракции (0,2 мл) РНКазы из поджелудочной железы быка (0,04 мкг) в 0,1%-ном растворе желатина, который предварительно подвергали анализу [7]. При определении активности РНКазы в пробах с добавлением ингибитора и без него их инкубировали 15 мин. Активность ингибитора выражали в процентах торможения активности добавленной РНКазы.

Результаты исследований

При выработке условного оборонительного рефлекса как в течение 5 дней (5-дневная схема тренировки), так и за 1 день (массированное обучение) животные получали одинаковое число (100) сочетаний условного раздражителя с безусловным. Число условных рефлексов за весь период обучения при 5-дневной тренировке достигало 35—40% от числа примененных сигналов; при массированном обучении эта цифра не превышала 10%.

Таблица 1

Влияние 1- и 5-дневного обучения на суммарную активность кислой РНКазы (ΔE_{260} /мг белка) лизосомной и синапсомной фракций

Состояние животных	Один экспериментальный сеанс (100 сочетаний)		Пять экспериментальных сеансов (100 сочетаний)	
	ЛФ	СФ	ЛФ	СФ
Пассивный контроль	17,50±0,57	5,00±0,25	17,80±0,20	5,20±0,14
Активный контроль	18,90±0,78	5,06±0,17	21,90±0,42***	5,00±0,33
Обучение	18,90±0,57	6,45±0,08**	22,70±0,57	7,90±0,12***

Примечание. Для табл. 1, 2: *— $p < 0,05$; **— $p < 0,01$; ***— $p < 0,001$; количество животных $n=8$

Таблица 2

Влияние 1- и 5-дневного обучения на активность свободного белкового ингибитора щелочной РНКазы (%) и на суммарную активность щелочной РНКазы (ΔE_{260} /мг белка) (определение с 10^{-4} М п-ХМБ) и активность ее свободной фракции в цитозоле больших полушарий головного мозга крыс

Состояние животных	Один экспериментальный сеанс (100 сочетаний)			Пять экспериментальных сеансов (100 сочетаний)		
	Ингибитор	РНКазы рН 7,8		Ингибитор	РНКазы рН 7,8	
		свободная	суммарная		свободная	суммарная
Пассивн. контроль	52,70±0,82	0,07±0,01	1,23±0,11	54,1±1,0	0,06±0,02	1,34±0,06
Активн. контроль	46,30±1,85*	0,06±0,02	1,35±0,05	40,6±0,9**	0,07±0,01	1,51±0,07
Обучен.	38,00±0,75**	0,07±0,01	1,66±0,06**	42,5±1,2	0,07±0,01	2,07±0,34*

В табл. 1 представлены результаты определения активности кислой РНКазы, а в табл. 2 — активности щелочной РНКазы и ее белкового ингибитора у обученных, псевдообученных и контрольных (пассивный контроль) животных при использовании 1- и 5-дневной схем тренировки. Достоверность обнаруженных изменений устанавливали при сопоставлении рядов: выработка условного рефлекса—псевдообучение (активный контроль); активный контроль—пассивный контроль.

Полученные данные показывают, что суммарная активность кислой РНКазы у контрольных животных в ЛФ составляла в среднем

$17,50 \pm 0,57 \Delta E_{260}/\text{мг}$ белка, а в СФ— $5,20 \pm 0,14$, что согласуется с материалами предыдущих исследований [3]. После массированного обучения и псевдообучения (табл. 1) достоверных изменений активности кислой РНКазы в ЛФ обнаружено не было. При 5-дневной схеме тренировки в ЛФ у псевдообученных животных и крыс, подвергнутых выработке условного оборонительного рефлекса, активность лизосомной кислой РНКазы увеличивалась одинаково и была на 20% больше, чем у контрольных (пассивный контроль).

В СФ суммарная активность кислой РНКазы была увеличенной только у обученных животных как после массированного 1-дневного обучения, так и после 5-дневного (на 25 и 50% соответственно). У псевдообученных животных изменений активности кислой РНКазы в СФ обнаружено не было.

Одновременно с исследованием кислой РНКазы у тех же животных были проведены определения активности щелочной РНКазы и свободного белкового ингибитора в растворимой клеточной фракции. После массированного обучения у обученных животных в растворимой фракции больших полушарий головного мозга крыс уменьшалась активность свободного ингибитора и увеличивалась доля щелочной РНКазы, связанной с ингибитором (табл. 2). Еще более значительное увеличение содержания неактивных комплексов щелочной РНКазы с ингибитором наблюдали у животных, подвергнутых 5-дневному обучению. Однако в последнем случае у обученных животных по сравнению с псевдообученными изменений активности свободного ингибитора не было обнаружено. Псевдообучение (1- и 5-дневное) вызывало достоверное уменьшение активности свободного ингибитора в растворимой фракции.

Как видно из табл. 2, активность свободной, не связанной с ингибитором фракции щелочной РНКазы в цитозоле больших полушарий головного мозга была незначительна у всех обследованных групп животных и составляла всего 4—5% от величины суммарной активности щелочной РНКазы.

Обсуждение результатов

Кислая и щелочная РНКазы в клетках головного мозга находятся главным образом в латентном неактивном состоянии. Кислая РНКаза локализована в основном в лизосомах, а также в СФ и микросомной фракциях. Щелочная РНКаза находится в цитозоле в виде неактивных комплексов со специфическим белковым ингибитором. Внутриклеточная регуляция активности латентных РНКаз может осуществляться, прежде всего, путем перехода их из связанного (неактивного) состояния в свободное и обратно. Результаты проведенных опытов подтвердили полученные ранее данные о том, что после выработки условного оборонительного рефлекса активность кислой РНКазы, определяемой с тритоном X-100 в гомогенате, ЛФ и СФ больших полушарий головного мозга, увеличивается [1—4]. Исследование различных фракций

РНКаЗ у обученных, псевдообученных и интактных животных с использованием двух схем тренировки позволило выяснить некоторые особенности и внутриклеточную локализацию изменений активности кислой и щелочной РНКаЗ при обучении. Активный контроль (псевдообучение) позволяет разграничить те изменения, которые обусловлены воздействием стрессорных, сенсорных и двигательных влияний, сопровождающих выработку условного оборонительного рефлекса, от изменений, возникающих вследствие обучения. Выработка условного оборонительного рефлекса и псевдообучение вызывали изменения активности кислой и щелочной РНКаЗ, неодинаковые в различных субцеллюлярных фракциях. Полученные результаты показали, что 5-дневное и массированное обучение по сравнению с псевдообучением приводили к увеличению активности кислой РНКаЗы в СФ и повышению содержания неактивных комплексов щелочной РНКаЗы со специфическим белковым ингибитором в цитозоле. Причем 5-дневное обучение, при котором общее число вызовов условного рефлекса было в 3—4 раза больше, чем при массированном, сопровождалось большими сдвигами, чем массированное обучение. Можно предположить, что существует специфическая взаимосвязь увеличения активности кислой РНКаЗы в СФ и щелочной РНКаЗы в растворимой клеточной фракции с процессами долговременной памяти. Показано, что процессы консолидации памяти сопровождаются увеличением синтеза РНК [8, 9] и изменением их нуклеотидного состава [10], увеличением синтеза белков [11] и активности щелочной РНКаЗы [8] гомогената в различных областях головного мозга. Следует подчеркнуть, что, как показали предыдущие данные [3], выработка условного оборонительного рефлекса не сказывается на активности кислой РНКаЗы микросомной фракции. В ЛФ увеличение активности кислой РНКаЗы было одинаковым у обученных и псевдообученных животных и возникало, вероятно, лишь под влиянием стрессорной реакции, развивавшейся при стимуляции животных электрическим током.

Роль лизосом в метаболизме и функциональной деятельности головного мозга изучена еще очень мало. Поэтому обнаруженные изменения активности кислой РНКаЗы лизосом, возникавшие при функциональной нагрузке, привлекают внимание и требуют дальнейшего изучения.

Сравнительное определение активности свободной и связанной с ингибитором фракций щелочной РНКаЗы показало, что более 94% щелочной РНКаЗы надосадочной фракции больших полушарий головного мозга находится в неактивном, латентном состоянии, и ее активность обнаруживается только после инактивации ингибитора. Расчет показывает, что в цитозоле активность свободного ингибитора превышает активность связанного приблизительно в 6—8 раз. У псевдообученных животных и у животных после массированного обучения активность свободного ингибитора уменьшалась, однако содержание свободной РНКаЗы в цитозоле не увеличивалось.

Ингибитор—кислый белый белок с M около 50 000—распространен почти во всех тканях млекопитающих [12—14]. В опытах *in vitro* показано [14], что ингибитор оказывает защитное действие на мРНК, предотвращая расщепление ее РНКазой. По-видимому, лабильная система ингибитор—щелочная РНКазы может быть регулятором процессов расщепления цитоплазматической РНК также и в клетках нервной ткани.

EFFECTS OF LEARNING AND PSEUDOLEARNING ON THE ACTIVITY OF ACID AND ALKALINE RIBONUCLEASE AND ON THE ALKALINE RIBONUCLEASE INHIBITOR IN RAT BRAIN HEMISPHERES SUBCELLULAR FRACTIONS

NECHAEVA G. A., LOPATINA N. G.

Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

A conditioned defensive reflex in rats has been formed by pairing of a conditioned stimulus (light) with unconditioned one (electric current 1.5 A) either for 5 days running (20 pairings per day) or for 100 pairings per day (massive learning). In both cases it led to an increase in the acid RNase activity in the synaptosomal fraction. At the same time it resulted in the elevated alkaline RNase-protein inhibitor inactive complex in the soluble fraction. The inhibiting capacity of this protein inhibitor diminished both on massive learning and pseudolearning. The activity of acid RNase in the lysosomal fraction increased for 20% after 5 days' learning and pseudolearning.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демин Н. Н., Нечаева Г. А., Федоров В. К. ДАН СССР, 197, 977—979, 1971.
2. Федоров В. К., Нечаева Г. А., Демин Н. Н. Физиол. ж. СССР, 58, 322—328, 1972.
3. Нечаева Г. А., Лопатина Н. Г., Гладкая А. Ф. Физиол. ж. СССР, 40, 967—969, 1979.
4. Нечаева Г. А., Лопатина Н. Г. Тез. докл. IV Всесоюзн. конференции, Пушкино, с. 30—31, 1979.
5. Whittaker V. P.—In.: Handbook of Neurochemistry, N. Y., 3, 327—362, 1969.
6. Нечаева Г. А. Укр. биохим. ж., 44, 178—181, 1972.
7. Imrie R. C., Hutchison W. C. Biochim. Biophys. Acta, 108, 106—113, 1965.
8. Gattoni R. C., Izquierdo I. Behav. Biol., 12, 67—80, 1974.
9. Glasman E. Annu. Rev. Biochem., 38, 605—646, 1969.
10. Hyden H., Egyhazi E., John E. R., Bartlett F. J. Neurochem., 16, 813—821, 1969.
11. Глущенко Т. С. Физиол. ж. СССР, 30, 35—39, 1979.
12. Roth J. S. Biochim. Biophys. Acta, 21, 34—43, 1956.
13. Kraft N., Shortman K. Austral. J. Biol. Sci., 23, 175—184, 1970.
14. Takahashi Y., Mase K., Sugano H. Biochim. Biophys. Acta, 119, 627—629, 1966.

Институт физиологии им. И. П. Павлова
АН СССР, Ленинград

Поступила 12.X 1981