

УДК 612.822.1+612.821.6

МЕТАБОЛИЗМ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ НЕЙРОНОВ И ГЛИОЦИТОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ УСЛОВНОГО ПИЩЕВОГО РЕФЛЕКСА (АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКОЕ И ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

КЛЕНИКОВА В. А., ГЛУЩЕНКО Т. С.

С помощью количественной автораддиографии и двухволнового метода цитофото- метрии показано, что при воспроизведении условного пищевого рефлекса (через 7 дней после его выработки) отношение содержания белков к интенсивности включения автораддиографической метки было снижено в ядрах нейронов зоны Ca_3 гиппокампа. В клетках перинейрональной глии какие-либо изменения отсутствовали.

Имеющиеся литературные данные [1—4], а также результаты собственных исследований [5, 6] свидетельствуют о том, что в нервных механизмах обучения в той или иной мере участвуют белки нервной ткани. Ранее было показано, что воспроизведение условного пищевого рефлекса у крыс приводило к изменениям количества белков в системе нейрон—нейроглия некоторых отделов головного мозга [7].

Такие сдвиги содержания белков в клеточных структурах ЦНС могли быть связаны с изменением скорости их метаболизма. Поэтому казалось целесообразным провести количественное автораддиографическое определение обновления белков в нейронах и глиоцитах в тех же условиях эксперимента.

Материалы и методы

Опыты были поставлены на взрослых крысах-самцах линии Вистар. Пищевой условный рефлекс вырабатывали ежедневно в течение 4 дней в У-образном лабиринте по несколько измененной схеме Лешли. Условным сигналом служил свет электрической лампочки, безусловным подкреплением—семя подсолнуха. Исследовали группы крыс с выработанным рефлексом, активного (животные, которым условный сигнал подавали с таким же интервалом и в той же последовательности, но корм находился в кормушках постоянно) и пассивного контролей. Спустя неделю после завершения обучения крыс снова помещали в условия лабиринта, предъявляли им те же и в той же последовательности условные сигналы, но без пищевого подкрепления. Исследовали только тех крыс, которые совершали не менее 80% правильных побегов. Детали

эксперимента были описаны ранее [7, 8]. Для определения интенсивности белкового синтеза крысам за 1 ч до окончания эксперимента внутрибрюшинно вводили DL- ^3H -фенилаланин (удельная активность 1,36 K_u /ммоль, «Reanal», Венгрия) в дозе 10 мK_u /г. Животных забивали без наркоза быстрым обезглавливанием. При автордиографическом исследовании нервной ткани этот срок является оптимальным [9]. Головной мозг фиксировали в охлажденной смеси Карнуа, обезживали по общепринятой схеме и заливали в парафин. Объектами исследования служили зона CA_3 гиппокампа, участие которой в механизмах обучения и памяти не вызывает сомнений, и клетки V слоя двигательной и зрительной зон коры больших полушарий для оценки неспецифического активирования ИС. Срезы толщиной 5 мкм после освобождения от парафина покрывали жидкой фотоэмульсией типа «М» и экспонировали 40 дней при 8° . Проявленные автографы окрашивали гематоксилином. Интенсивность включения меченой аминокислоты оценивали по числу зерен восстановленного серебра, измеряемому абсорбционным способом путем фотометрирования автографа широким пучком монохроматического света на двухлучевом микроспектрофотометре «Марш» [10]. Параллельные срезы окрашивали амидочерным 10 Б на суммарные белки [11, 12]. Количество белка (в усл. ед.) в расчете на одно ядро нейрона или глиоцита определяли двухволновым методом цитофотометрии на микрофотометре МЦФУ-1 при 605 и 660 мкм [10, 12]. Весь цифровой материал, по 100—120 клеток от 5—6 животных, обрабатывали статистически; достоверность отличий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

У крыс с выработанным рефлексом и группы активного контроля по отношению к пассивному наблюдали усиление включения меченого ^3H -фенилаланина в суммарные белки ядер нейронов зоны CA_3 гиппокампа и V слоя двигательной зоны коры больших полушарий (табл. 1). В других исследованных нами клеточных структурах достоверных изменений интенсивности включения ^3H -фенилаланина в ядерные белки отмечено не было. В обеих группах животных по сравнению с пассивным контролем было выявлено повышение количества ядерных белков в нейронах зоны CA_3 гиппокампа. Можно полагать, что изменения метаболизма белков, наблюдаемые у обученных крыс и животных группы активного контроля по отношению к пассивному, по-видимому, были связаны с неспецифическим активированием ИС: включением световых сигналов, ориентировочной реакцией, ожиданием корма и т. д.

Вопрос о контролях в исследовании метаболических коррелятов процессов обучения и памяти остается очень существенным и требует использования разных методических подходов и моделей обучения [3, 4].

Ранее было показано, что для начальной стадии выработки условного пищевого рефлекса характерно усиление биосинтеза нейрональных

белков [8]. Обучение же в течение 4-х дней, закрепляющее уже сформированную временную связь, по нашим данным, не сопровождалось таким усилением метаболизма суммарных белков по сравнению с активным контролем. Может быть, последующие этапы консолидации памяти затрагивают лишь ограниченное число клеточных белков, в первую очередь мозгоспецифических. Изменения метаболизма этих белков, составляющих доли процента от общей массы белков мозга, могут лежать за пределами чувствительности примененных методов.

Таблица 1

Включение ^3H -фенилаланина в ядерные белки нейронов и глиоцитов головного мозга крыс при воспроизведении условного пищевого рефлекса

Вид клеток	Пассивный контроль	Активный контроль	4-дневное обучение	Воспроизведение
Гиппокамп CA_3 нейрон	$0,320 \pm 0,010$	$0,370 \pm 0,012^*$	$0,360 \pm 0,012^*$	$0,380 \pm 0,014$
глиоцит	$0,270 \pm 0,013$	$0,280 \pm 0,016$	$0,280 \pm 0,015$	$0,270 \pm 0,013$
Двигательная зона V слой				
нейрон	$0,310 \pm 0,014$	$0,430 \pm 0,012^*$	$0,410 \pm 0,012^*$	$0,400 \pm 0,014$
глиоцит	$0,260 \pm 0,009$	$0,250 \pm 0,015$	$0,270 \pm 0,015$	$0,280 \pm 0,014$
Зрительная зона V слой				
нейрон	$0,450 \pm 0,012$	$0,450 \pm 0,017$	$0,440 \pm 0,016$	$0,480 \pm 0,016$
глиоцит	$0,250 \pm 0,010$	$0,240 \pm 0,015$	$0,250 \pm 0,012$	$0,280 \pm 0,014$

Примечание. Об интенсивности включения ^3H -фенилаланина судили по величине оптической плотности, отражающей концентрацию зерен восстановленного серебра над исследуемыми клетками (число зерен на единицу площади клетки). $*p < 0,05$ (по отношению к пассивному контролю)

При воспроизведении условного пищевого рефлекса в нашей постановке эксперимента отличия во включении ^3H -фенилаланина в суммарные белки ядер нейронов и глиоцитов всех исследованных отделов головного мозга отсутствовали по сравнению с группой обученных животных (табл. 1). Содержание же суммарных ядерных белков в нейронах и глиоцитах зоны CA_3 гиппокампа и V слоя двигательной зоны коры у тех же крыс, по полученным данным, было несколько снижено (табл. 2). В ядрах нейронов и глиоцитов V слоя зрительной зоны коры изменения количества суммарных белков не были выявлены (табл. 2).

Мы рассчитали еще один косвенный показатель метаболизма белков, используя данные цитофотометрии и автордиографии. Комбинирование этих двух методов успешно используют, например, при исследовании клеточного цикла, определяя продолжительность отдельных фаз митоза [13, 14]. Применение такого комплексного подхода для изучения метаболизма белков, углеводов на клеточном уровне встречается значительно реже. Так, было предложено [15] для оценки белкового метаболизма в скелетной мышечной ткани использовать отношение оптической плотности белков к интенсивности автордиографической метки. Действительно, при воспроизведении условного пищевого рефлекса отношение содержания суммарных белков в ядре клетки к интенсивности включения меченого ^3H -фенилаланина в ядерные белки, по на-

шим данным, было достоверно снижено в ядрах нейронов зоны СА₃ гиппокампа по сравнению с обученными животными; в глиоцитах данной зоны какие-либо изменения отсутствовали (табл. 3).

Таблица 2

Содержание суммарных белков в ядрах нейронов и глиоцитов головного мозга при воспроизведении условного пищевого рефлекса

Вид клеток	Пассивный контроль	Активный контроль	4-дневное обучение	Воспроизведение
Гиппокамп СА ₃				
нейрон	$0,870 \pm 0,015$	$0,940 \pm 0,017^*$	$0,930 \pm 0,017^*$	$0,820 \pm 0,015^{**}$
глиоцит	$0,880 \pm 0,018$	$0,890 \pm 0,017$	$0,880 \pm 0,016$	$0,780 \pm 0,015^{**}$
Двигательная зона V слой				
нейрон	$0,930 \pm 0,013$	$0,920 \pm 0,013$	$0,910 \pm 0,013$	$0,840 \pm 0,013^{**}$
глиоцит	$0,910 \pm 0,019$	$0,840 \pm 0,017$	$0,840 \pm 0,017$	$0,770 \pm 0,012^{**}$
Зрительная зона V слой				
нейрон	$0,940 \pm 0,013$	$0,930 \pm 0,014$	$0,910 \pm 0,015$	$0,910 \pm 0,011$
глиоцит	$0,920 \pm 0,013$	$0,910 \pm 0,015$	$0,900 \pm 0,014$	$0,890 \pm 0,013$

Примечание. * $p < 0,05$ (по отношению к пассивному контролю); ** $p < 0,05$ (по отношению к обучению)

По данным Hydén, Lange [16], воспроизведение ранее полученных навыков через 4 недели после обучения (в отличие от результатов опытов в нашей постановке они применяли дополнительное подкрепление) сопровождалось значительным снижением включения ³H-лейцина в белки ряда отделов головного мозга (гиппокампа, зубчатой фасции и др.). Это, видимо, свидетельствует о том, что при различных видах и

Таблица 3

Отношение содержания суммарных белков в клеточных ядрах к интенсивности включения ³H-фенилаланина в белки при воспроизведении условного пищевого рефлекса

Вид клеток	Пассивный контроль	Активный контроль	4-дневное обучение	Воспроизведение
Гиппокамп СА ₃				
нейрон	$2,70 \pm 0,11$	$2,50 \pm 0,10$	$2,60 \pm 0,10$	$2,20 \pm 0,09^{**}$
глиоцит	$3,20 \pm 0,16$	$3,20 \pm 0,19$	$3,10 \pm 0,17$	$2,90 \pm 0,15$
Двигательная зона V слой				
нейрон	$3,00 \pm 0,15$	$2,10 \pm 0,07^*$	$2,20 \pm 0,07^*$	$2,10 \pm 0,03$
глиоцит	$3,50 \pm 0,07$	$3,40 \pm 0,20$	$3,10 \pm 0,18$	$2,70 \pm 0,13$
Зрительная зона V слой				
нейрон	$2,20 \pm 0,07$	$2,10 \pm 0,09$	$2,10 \pm 0,08$	$1,90 \pm 0,06$
глиоцит	$3,50 \pm 0,17$	$3,70 \pm 0,20$	$3,60 \pm 0,18$	$3,20 \pm 0,16$

Обозначения те же, что и в табл. 2

стадиях обучения вовлекается белковый метаболизм различных клеточных структур нервной ткани. Для этапа воспроизведения, по-видимому, все-таки важно действие «напоминания» или подкрепления, которое способствует переводу латентного следа обучения в активное состояние [17]. Но и в нашей постановке эксперимента (без дополнительного подкрепления) воспроизведение новой информации приводило к снижению

интенсивности белкового метаболизма гиппокампа. Обращает на себя внимание тот факт, что эти сдвиги наблюдали, главным образом, в нейронах. Полученные данные подтверждают положение о ведущей роли метаболизма нейрона в деятельности единой функциональной системы нейрон—нейроглия.

METABOLISM OF NUCLEAR PROTEINS IN NEURONS AND GLIOCYTES OF RAT BRAIN AFTER THE RETRIEVAL FOOD CONDITIONING (AUTORADIOGRAPHIC AND CYTOPHOTOMETRIC ANALYSIS)

KLENIKOVA V. A., GLUSHCHENKO T. S.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

By means of autoradiography and double wave-length cytophotometry it was revealed that the ratio of the total proteins content to labelled phenylalanine incorporation in the proteins of nuclei decreased in CA₁ hippocampal neurons after the retrieval food conditioning.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Hudén H.* Macromolecules and Behavior. Birmingham, 1972.
2. *Дергачев В. В.* Молекулярные и клеточные механизмы памяти, М., Медицина, с. 256, 1977.
3. *Кометиани П. А., Алексидзе Н. Г., Клейн Е. Э.* Нейрохимические аспекты памяти (под ред. Р. И. Кругликова), Тбилиси, с. 198, 1980.
4. *Кругликов Р. И.* Нейрохимические механизмы обучения и памяти (под ред. М. Н. Ливанова), М., Наука, с. 211, 1981.
5. *Glushchenko T. S., Pevzner L. Z., Klenikova V. A.* Pharmac. Biochem. Behav., 11 2, 1979.
6. *Кленикова В. А.* Физиол. ж. СССР, 66, 505—507, 1980.
7. *Кленикова В. А., Кулагин Д. А., Лопатина Н. Г.* Физиол. ж. СССР, 67, 371—374, 1981.
8. *Глушченко Т. С., Кулагин Д. А., Лопатина Н. Г., Певзнер Л. З.* Физиол. ж. СССР, 64, 1386—1390, 1978.
9. *Грачева Н. Д.* Автораддиография синтеза нуклеиновых кислот и белков в нервной системе (под ред. Л. Н. Жинкина), Л., Наука, с. 136—158, 1968.
10. *Агроскин Л. С., Папаян Г. В.* Цитопhotометрия (под ред. В. Я. Бродского), Л., Наука, с. 295, 1977.
11. *Geyer G.* Acta histochem., 10, 4, 286—292, 1960.
12. *Klenikova V. A., Pevzner L. Z.* Microsc. Acta, 82, 3, 207—214, 1979.
13. *Mak S.* Exp. Cell Res., 39, 1, 286—289, 1965.
14. *Fujita S.* Exp. Cell Res., 88, 2, 395—401, 1974.
15. *Данилов Р. К.* Цитология, 22, 481—483, 1974.
16. *Hudén H., Lange P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1980—1984, 1972.
17. *Греченко Т. Н.* Нейрофизиологические механизмы памяти, М., Наука, с. 105, 1979.

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

Поступила 2. VIII 1982