



УДК 612.05:612.843.7

## АКТИВНОСТЬ СИНАПТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ АХЭ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ РАННЕЙ БИНОКУЛЯРНОЙ ДЕПРИВАЦИИ КРОЛИКА

ОРЛОВА Е. И.

НИИ мозга ВНИЦ психического здоровья АМН СССР, Москва

На фракциях синапсом (С и D) и субфракциях синапсомных мембран (С<sub>2</sub>, С<sub>4</sub>, С<sub>4</sub> и D<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>2</sub> соответственно) зрительной, сенсомоторной и слуховой областей коры мозга кролика изучена активность АХЭ у животных, выращенных в условиях нормального светового режима (норма) и 2,5-месячной ранней бинокулярной депривации. В норме АХЭ выявлена во всех мембранных субфракциях, но распределение ее активности в них в пределах каждой области очень неравномерно. Предполагается, что в субфракции объединяются мембраны синапсов, имеющих общее происхождение или локализацию на нейроне. Зрительная депривация, активируя АХЭ во фракциях синапсом, не влияет на состояние мембраносвязанной АХЭ зрительной области, что не согласуется с данными литературы о глубине воздействия депривации на проекционные нейроны. Делается вывод, что АХ не является медиатором синапсов проекционных зрительных нейронов.

Поиск медиаторного обеспечения передачи зрительных импульсов активно разрабатывается в современной нейробиологии. С этой целью часто используется модель ранней зрительной депривации, поскольку позволяет блокировать определенное морфо-функциональное звено анализатора—передачу сенсорных сигналов на проекционные нейроны. Морфологические и физиологические эксперименты показывают, что при бинокулярной депривации (конка) афферентные связи нейронов полей 17 и 18 страдают очень значительно [1, 2].

Данные о состоянии АХ-системы в мозгу животных (кролик, крыса), подвергнутых бинокулярной депривации разноречивы. В большинстве исследований, проведенных на фракционном материале зрительной коры депривированных животных—фракциях нейропиля [3], неочищенных митохондрий и синапсом [4], не обнаружено различий в активности АХЭ по сравнению с нормой на сроках завершения постнатального онтогенеза. Изменения в активности холинэстеразы (АТ) или отсутствуют [5], или незначительны, в пределах 15–20% [3], как и изменения в количестве связанного с мускариновыми холинорецепторами лиганда [6]. Незначительность изменений не коррелировала с глубиной депривации; некоторые авторы пришли к выводу, что выращивание животных в темно-

те не влияет на обмен АХ и свойства М-холинорецепторов [3, 5, 6]. Однако в других публикациях снижение активности АХЭ в пределах 30% во фракции синапсом поля 17 и в нейрониле (гистохимическое исследование) слоев III, IV, V поля 17 мозга кроликов рассматривается как свидетельство важной роли холинергических механизмов в осуществлении зрительного акта [7].

Учитывая противоречивость литературных данных, а также сведения о возможности специфическом подавлении активности синаптической АХЭ, мы сочли целесообразным исследовать этот фермент в субфракциях синапсомных мембран. Известно, что только мембраносвязанная АХЭ участвует в нервной передаче [8] и, следовательно, прямо должна отражать недоразвитие этой медиаторной системы, если АХ является медиатором проекционных нейронов или их афферентов.

### Материалы и методы

В работе использовали мозг 69 кроликов. Для эксперимента требовалось 1,2—1,5 г сырого веса ткани, поэтому мозг 2—3 животных объединялся. Субфракции синапсомных мембран изолировали раздельно из фракций легких (субфракции С<sub>2</sub>, С<sub>3</sub>, С<sub>4</sub>) и тяжелых (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>) синапсом в градиенте плотности сахарозы модифицированным методом, описанным ранее [9]. Субфракции С<sub>2</sub> и D<sub>2</sub> сконцентрированы на границе слоев 0,6—0,8 М сахарозы, субфракции С<sub>3</sub> и D<sub>3</sub>—0,8—1,0 М, С<sub>4</sub> и D<sub>4</sub>—1,0—1,2 М сахарозы. Чистота мембранных субфракций установлена с помощью биохимического и электронномикроскопического контроля [9, 10]. Исследованы субфракции синапсомных мембран зрительной, сенсомоторной и слуховой областей коры больших полушарий в двух экспериментальных группах животных—выращенных в условиях нормального светового режима (11—15-недельные кролики) и в условиях зрительной депривации (кроликов содержали в темновой камере с 5—7-дневного возраста до прозревания (до 10—11 недель жизни). Спектрофотометрически определяли активность АХЭ [11], а также содержание белка по Lowry. Достоверность оценивали по t-критерию Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

В норме в зрительной, сенсомоторной и слуховой областях во фракциях легких синапсом С величина У. А. АХЭ значительно (в 1,6—2 раза) превосходит таковую во фракциях тяжелых синапсом D, что неоднократно было показано ранее [4, 12]. Неоднородность по этому показателю еще более выражена при послыйном сравнении субфракций синапсомных мембран (табл. 1). Максимальная активность АХЭ наблюдается в С<sub>2</sub>, средняя—в D<sub>2</sub> и С<sub>3</sub>, минимальная—в D<sub>3</sub>, С<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, более чем в 3 раза различаясь в своих крайних значениях. Таким образом, субфракции синапсомных мембран весьма неравнозначны по активности АХЭ, и это в одинаковой мере относится к любой из исследованных областей.

В гистохимических (АХЭ-реакция) и иммуногистохимических (ХАТ-реакция) исследованиях показано неравномерное распределение холинергических терминалей по цитоархитектоническим слоям коры мозга млекопитающих [13—15]. Напрямывалась аналогия, что неодинаковая У. А. АХЭ в наших субфракциях отражает цитоархитектонику АХ-окончаний, однако это, по-видимому, не так. Во-первых,

последнее распределение АХ-ергичных окончаний в разных областях неодинаково [13, 15]. Во-вторых, недавно получены доказательства, что слонотство ХАТ-содержащих терминалей в областях новой коры обеспечивают нейроны крупноклеточных базальных ядер переднего мозга [15]. Показано также, что практически все (99%) ХАТ-позитивные окончания являются симметричными и располагаются они преимущественно на тонких веточках дендритов и аксонов [13].

Таблица 1

Величина  $M$ ,  $\Delta$  АХЭ во фракциях синапсом и субфракциях синапсомных мембран различных областей коры мозга кролика в норме (мкмоль АХ/мг белка-с)

Фракция	$M \pm \Delta$	$P_{(C_1)}$	$P_{(C_2)}$	$P_{(D_2)}$	$P_{(D_3)}$
I	C	4.08 ± 0.35 (10)			
	C <sub>2</sub>	15.65 ± 1.25 (10)			0.01
	C <sub>3</sub>	8.38 ± 0.91 (11)	0.01		
	C <sub>4</sub>	5.18 ± 0.61 (11)	0.01	0.01	0.01
	D	2.07 ± 0.24 (13)			
	D <sub>2</sub>	10.75 ± 1.36 (15)	0.02		
	D <sub>3</sub>	6.20 ± 0.70 (14)	0.01		0.02
D <sub>4</sub>	1.40 ± 0.60 (12)	0.01	0.01	0.01	
II	C	2.18 ± 0.78 (7)			
	C <sub>2</sub>	11.00 ± 1.13 (8)			0.05
	C <sub>3</sub>	6.00 ± 0.39 (7)	0.01		
	C <sub>4</sub>	3.94 ± 0.36 (7)	0.01	0.01	0.01
	D	1.95 ± 0.49 (9)			
	D <sub>2</sub>	7.42 ± 1.10 (8)	0.05		
	D <sub>3</sub>	4.33 ± 0.56 (7)	0.01	0.05	0.05
D <sub>4</sub>	3.76 ± 0.57 (9)	0.01	0.01	0.01	
III	C	4.77 ± 0.51 (5)			
	C <sub>2</sub>	13.33 ± 1.49 (5)			0.01
	C <sub>3</sub>	7.41 ± 0.80 (5)	0.01		
	C <sub>4</sub>	4.18 ± 0.32 (4)	0.01	0.01	0.02
	D	2.35 ± 0.51 (5)			
	D <sub>2</sub>	8.08 ± 1.09 (4)	0.05		
	D <sub>3</sub>	5.70 ± 0.66 (4)	0.01		
D <sub>4</sub>	4.77 (1)				

*Примечание.* I, II, III—зрительная, сенсомоторная, слуховая области соответственно. В скобках обозначено количество опытов.  $P_{(C_i)}$ —вероятность по распределению Стьюдента по отношению к соответствующей фракции. В сетку внесены и проставлены значения вероятностей только в случае достоверных различий. Обозначения фракций см. в тексте.

Эти данные указывают на большую вероятность морфологической идентичности синапсов нейронов базальных ядер и концентрации их мембран не в разных, а в какой-то одной субфракции. Учитывая, что нервные окончания этих нейронов составляют большую часть АХ-ергичных окончаний коры [15, 16], можно предположить, что это субфракция C<sub>2</sub>, обогащенная АХЭ-содержащими синаптическими мембранами.

Общность происхождения холинэргичных компонентов новой коры—нейронов базальных ганглиев и собственных нейронов [13, 16]—обеспечивает, по-видимому, сходство между областями в распределении фермента во мембранных субфракциях. Вместе с тем возможно, что

одинаковый набор ХАТ-терминалей в областях коры [13, 15] определяет одинаковое количество мембранных субфракций, а сходство их плотностных характеристик [15]—близкие количественные соотношения. Вероятность локализации АХЭ на синапсах других модальностей дополняет общую картину, так как их происхождение для всех областей новой коры также едино [16].

Таким образом, результаты, полученные нами в норме, позволяют предполагать, что субфракции объединяют мембраны синапсов, имеющих общее происхождение и клеточную локализацию.

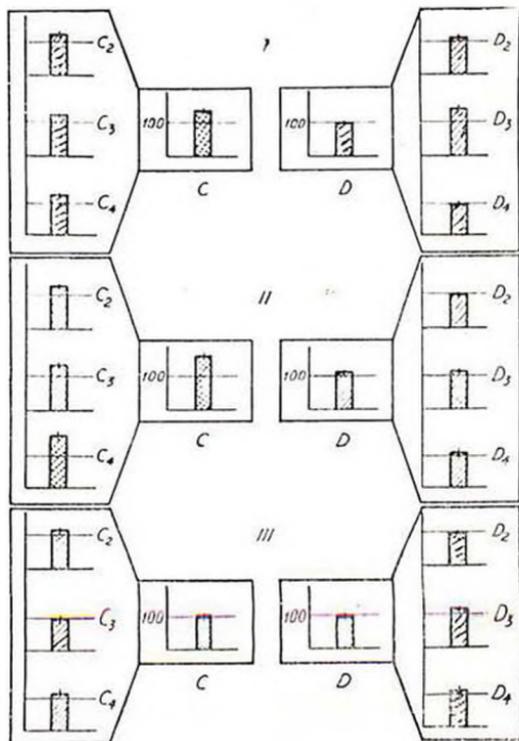


Рис. 5. А. АХЭ во фракциях синапсом и субфракциях синапсомных мембран в условиях зрительной депривации. Величины выражены в процентах по отношению к норме, принятой за 100%. I—зрительная область (12—13 опытов), II—сенсомоторная (9—12 опытов), III—слуховая (6 опытов). Зантрихованные в клетку столбики показывают достоверные отклонения от нормы

В условиях зрительной депривации величина У. А. АХЭ нарастает во фракциях легких синапсом С и в зрительной, и в сенсомоторной областях—на 30 и 60% соответственно (рисунок). На уровне синапсомных мембран изменения наблюдаются только в сенсомоторной области—в субфракции С<sub>4</sub> активность фермента нарастает на 59%, не отличаясь от контрольных значений в остальных суб-

фракциях. При этом содержание белка во фракциях и субфракциях достоверно не изменяется. Активацию АХЭ во фракции С в аналогичном эксперименте наблюдали и ранее [12].

Итак, по нашим данным, зрительная депривация не влияет на активность АХЭ синапсомембранных мембран зрительной области, а изменения в активности мембраносвязанной АХЭ, наблюдаемые в субфракции С<sub>4</sub> сенсомоторной коры, в целом для области оказываются очень незначительными, так как последние составляет всего 10% от общей активности мембраносвязанного фермента (табл. 2).

Тем не менее во фракциях синапсомембран С зрительной и сенсомоторной областей коры мозга депривированных животных нами обнаружена достоверно более высокая величина У. А. АХЭ, чем у контрольных. Ни в той ни в другой области это не может быть обусловлено только мембраносвязанной АХЭ. Активность фермента в субфракциях С<sub>2</sub>, С<sub>3</sub>, С<sub>4</sub>, по нашим данным, составляет 22, 17, 15% соответственно от суммарной его активности во фракции С [10]. Даже с учетом недостоверных изменений общий эффект возрастания активности АХЭ в указанных субфракциях на 26, 11, 18% в зрительной области и на 22, 29, 59% в сенсомоторной (рисунок) не превышает, на уровне синапсомембран 11 и 19% в соответствующих областях. Поэтому мы предполагаем, что нарастание величины У. А. АХЭ в синапсомембранах может происходить за счет водорастворимых форм фермента, на долю которых приходится 35% от суммарной активности синапсомембранной АХЭ [10].

Таблица 2

Общая активность АХЭ в субфракциях синапсомембранных сенсомоторной области коры мозга кролика в норме (мкмоль АХ/г ткани·ч)

Фракция	$M \pm m$	% распределения
C <sub>2</sub>	5,28 ± 0,62	38
C <sub>3</sub>	2,34 ± 0,28	17
C <sub>4</sub>	1,42 ± 0,34	10
D <sub>2</sub>	2,30 ± 0,45	16
D <sub>3</sub>	1,30 ± 0,19	9
D <sub>4</sub>	1,35 ± 0,20	10
Σ	13,99	100

Примечание. Обозначения и количество опытов те же, что и в табл. 1.

Могут ли полученные данные свидетельствовать о присутствии АХ в синапсах проекционных нейронов в качестве медиатора? По данным литературы, при зрительной (бинокулярной) депривации у 2-месячных кроликов выявлены признаки морфологической незрелости в большинстве синаптических контактов поля 17 как по строению активных зон [17], так и по количеству синаптических пузырьков [18]. Практически отсутствует функциональная специализация (селективность) нейронов полей 17 и 18 (кошка, 2,5 месяца депривации) и значительно снижена их электрофизиологическая активность [2, 19, 20]. Сравнительные данные в этих и других работах свидетельствуют, что морфологическое строение синапсов и физиологические характеристики нейронов полей 17 и 18 у депривированных животных к 2—2,5 месячной жизни соответствуют уровню нервных 3—7 дней (до созревания) нормального постнатального онтогенеза.

В свою очередь в исследованиях активности АХЭ на разных сроках онтогенеза показано, что в коре больших полушарий мозга млекопитающих (мышь, крыса, кролик) активность фермента на 7-й день постнатального развития не превышает 20% таковой у взрослого животного [21, 22]. Если бы АХ отражал эргичность синапсов проекционных нейронов, то в соответствии с данными приведенной литературы следовало ожидать заметного снижения активности АХЭ в каких-либо субфракциях синаптосомных мембран зрительной коры депривированных кроликов по отношению к контрольным. Подобная задержка возрастного развития—на уровне первых дней постнатального онтогенеза—выявляется в системе индолакиламинов в обогащенных первыми окончаниями фракциях зрительной коры мозга зрительно депривированных крыс и кроликов [5, 23]. При этом существенно, что аналогичные изменения в двигательной или «остальной» коре менее выражены.

Таким образом, полученные нами данные в совокупности с известными из литературы позволяют заключить, что зрительная депривация не задерживает формирование АХЭ на ранней стадии онтогенеза. Это в свою очередь позволяет нам утверждать, что АХ является медиатором ни зрительных афферентов, ни корковых проекционных нейронов, по крайней мере мономодальных. Результаты настоящей работы подтверждают вывод, сделанный большинством исследователей, изучавших обмен АХ в мозгу депривированных животных [3, 5, 6], и хорошо согласуются со сведениями о неравномерном распределении плотности ХАТ-позитивных волокон и терминалей исключительно за счет отростков из базального переднего мозга [15]. Скопление ХАТ/АХЭ-позитивных волокон и мускариновых мест связывания в слоях основного сосредоточения проекционных зрительных нейронов (7, 13), по-видимому, связано с нерексционной функцией АХ-системы коры, включая волокна нейронов базальных ядер, в работе зрительного анализатора [14, 24, 25].

## MEMBRANE-BOUND SYNAPTIC ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY FROM NORMAL AND DARK-REARED RABBITS

ORLOVA E. I.

Brain Research Institute, National Research Center of Mental Health, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

Two and a half months old normal or dark-reared rabbits were used in the present study. AChE activity from synaptosome fractions (C and D) and synaptosome membrane subfractions (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, respectively) of visual, motor and auditory cortical areas were studied in both experimental groups. AChE was present in all membrane fractions of normal rabbits but the fraction distribution was very non-uniform in every area. It appears, that synaptic membranes of common origin and similar neuronal localization are present in every subfraction. Visual deprivation does not affect the membrane-bound AChE activity in the material from the visual cortex. This discrepancy with the literature, which describes a dramatic effect of visual deprivation on projective neurons allows us to conclude that acetylcholine is not the transmitter of projective visual neuron synapses.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Blakemore C., Van Slueters R. C. J. of physiol.*, v. 248, p. 663—716, 1975.
2. *Michalski A., Kossut M., Chmielowska J., Turlejcki K. Acta neurobiol. exp.*, v. 44, № 1, p. 1—15, 1984.
3. *Sinha A. K., Rose S. P. R. J. Neurochem.*, v. 27, № 4, p. 921—926, 1976.
4. Доведова Е. Л. Журн. высш. нервн. деят., т. 27, в. 2, с. 306—313, 1977.
5. *Biesold D., Bigl V., Uzbekov M. Activitas Nervosa Superior*, v. 19, № 2, p. 154—156, 1977.
6. Бисольд Д., Шлибс Р., Ротс Т., Аурих М., Унгеваггер Э., Бигл В. Цейрофизиология, т. 16, № 5, с. 691—701, 1984.
7. Доведова Е. Л., Буенюк М. М. — В кн.: Структурно-функциональные основы организации мозга. М., вып. 7, с. 117—121, 1978.
8. *Koelle G. B. J. Pharmacol.*, v. 120, p. 488—503, 1957.
9. Боголенов Н. Н., Доведова Е. Л., Орлова Е. Н., Яковлева Н. Н. Архив анатомии, т. 89, № 11, с. 88—93, 1985.
10. Орлова Е. Н., Доведова Е. Л. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 90, № 10, с. 427—429, 1980.
11. *Hestrin S. J. Biol. Chem.*, v. 180, № 1, p. 249—261, 1949.
12. Доведова Е. Л. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 86, № 9, с. 424—426, 1978.
13. *Parnavelas J. G., Kelly W., Franke E., Eckenstein F. J. Neurocytol.*, v. 15, № 3, p. 329—336, 1986.
14. *Barar M. F., Crites K. M., Ebner F. F. J. Comp. Neurol.*, v. 237, № 4, p. 513—532, 1985.
15. *Eckenstein F. J., Baughman R. W., Quinn J. Neuroscience*, v. 25, № 2, p. 457—474, 1988.
16. *Mesulam M. M., Mufson E. J., Levey A. L., Wainer B. H. J. Comp. Neurol.*, v. 214, p. 170—197, 1983.
17. *Müller L., Pattiselmoo A., Vrensen G. Brain Res.*, v. 205, № 1, p. 39—48, 1981.
18. *Vrensen G., de Groot D. Brain Res.*, v. 78, № 2, p. 263—278, 1974.
19. *Blakemore C., Price D. J. J. Physiol.*, v. 384, p. 393—399, 1987.
20. *Milleret C., Gary-Bobo E., Buisseret P. Exp. Brain Res.*, v. 71, № 1, p. 8—20, 1988.
21. Григорьева О. Н., Гусель В. А. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 17, № 1, с. 87—93, 1981.
22. *Hübmann C. F., Ebner F. F. Dev. Brain Res.*, v. 23, p. 225—241, 1985.
23. Узбеков М. Г., Мурфи Ш., Роуз С. П. Г., Пизарева З. Д. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 91, в. 4, с. 389—391, 1981.
4. *Sato H., Hatz Y., Haghara K., Tsumoto T. J. Neurophysiol.*, v. 58, № 4, p. 781—794, 1987.
25. *Sillito A. M., Kemp J. A. Brain Res.*, v. 289, p. 113—155, 1983.

Поступила 9.XI.1989