



ЭФФЕКТЫ АНТИСЫВОРОТКИ К МОЗГОСПЕЦИФИЧЕСКИМ БЕЛКАМ ГРУППЫ S-100, ВВОДИМОЙ *IN VIVO*: ВЛИЯНИЕ НА СИНТЕЗ МАКРОМОЛЕКУЛ В НЕЙРОНАХ И ГЛИИ МОЗГА КРЫС И БИОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ КРОЛИКОВ

ЖУРАВЛЕВ Б. В., МИАНИ Н., МИКЕТТИ Ф., ДОНАТО Р., ПОЛЕТАЕВ А. Б.

НИИ нормальной физиологии им. П. К. Анохина АМН СССР, Москва
Институт нормальной анатомии Католического университета, Рим, Италия.

В комплексных электрофизиологических и биохимических исследованиях анализировались изменения метаболизма и функциональной активности нейронов и глиальных клеток мозга животных, вызываемые антисывороткой к белкам группы S-100. Полученные данные свидетельствуют о том, что антитела к S-100, вводимые в желудочки мозга, достаточно быстро (часы) и генерализованно распространяются по ткани мозга, проникают внутрь клеток и взаимодействуют с соответствующими внутриклеточными антигенами-мишенями, изменяя их функционирование. Первичные эффекты антител, обусловленные изменениями со стороны систем антигенов-мишеней, имеют длительность порядка часов-дней; более поздние эффекты, по-видимому, обуславливаются вторичными изменениями метаболизма живых систем. Предполагается, что межклеточный перенос белков S-100, синтезируемых глиальными клетками, в нейроны имеет отношение к механизмам обучения и памяти. Направленные иммунологические воздействия на синтез мозгоспецифических белков группы S-100 могут (в зависимости от условий) как стимулировать, так и подавлять способность к формированию новых навыков.

Иммунологические методы находят все более широкое применение в нейрофизиологических исследованиях, связанных с изучением молекулярных механизмов поведения, электрогенных функций отдельных нервных клеток и анатомических образований ЦС и других проявлений интегративной деятельности [1, 2]. Это обуславливается чрезвычайно высокой направленностью иммунных воздействий, позволяющих оказывать избирательное влияние на молекулярные структуры нервной ткани, являющиеся антигенами-мишенями. Широкое использование иммунологических методов способно поднять нейрофизиологические эксперименты на качественно новый уровень. В то же время вопросы, связанные с практическим применением иммунологических воздействий в эксперименте *in vivo*, изучены крайне недостаточно.

Насколько продолжительно специфическое действие иммунной сыворотки, вводимой, к примеру, в желудочки мозга животных? Прони-

кают ли введенные в полости мозга антитела собственно в нервную ткань? Как далеко и насколько генерализованно они распространяются? Доступны ли внутриклеточные антигены иммунному воздействию? Какие последствия наблюдаются после первичного взаимодействия антител с антигенами *in vivo*? Ответы на эти вопросы могут быть весьма важны для обоснованной постановки и корректной интерпретации результатов многих физиологических экспериментов, в частности, свидетельствующих о том, что антисыворотки к одному и тому же антигену нервной ткани (мозгоспецифические белки группы S-100) в одних экспериментах полностью подавляли [1], а в других существенно ускоряли [3] процессы формирования новых поведенческих навыков.

В данной работе исследовалось влияние внутрижелудочкового введения антисыворотки к белкам S-100 на активность гиппокампальных нейронов мозга кроликов в ходе выработки у животных условного рефлекса. Параллельно был проведен анализ изменений биосинтеза суммарных РНК, суммарных белков и белков группы S-100 в клеточных фракциях нейронов и глиальных клеток, выделенных из мозга крыс в разные сроки после однократного иммунного воздействия.

Материалы и методы

В опытах использовали кроличью антисыворотку к белкам S-100 [4], немнунную кроличью сыворотку, ^3H -UDP и ^{14}C -лейцин («Amersham», Великобритания). Антисыворотку или немнунную сыворотку диализовали против 0,05 М трис-HCl буфера, pH 7,4 и вводили в левые боковые желудочки мозга крыс (линия Вистар, самцы массой 120—150 г) в дозе 20 мкл под легким эфирным наркозом. Дополнительная группа животных получала «ложные инъекции» — укол микрошприцем в область левого бокового желудочка. Спустя 3 ч, 1, 2, 4 и 6 суток после инъекции животных забивали цервикальной дислокацией и из гомогенатов мозга выделяли фракции, обогащенные нейронами и глиальными клетками. За 3 ч до забоя каждой крысе внутрибрюшинно вводили по 0,5 мкКл/г массы ^3H -UDP и ^{14}C -лейцин. В каждый из сроков забивали по 3 крысы из группы, получавших инъекции антисыворотки к белку S-100, немнунной сыворотки и «ложную инъекцию».

Получение фракций нейронов и глии из мозга крыс, экстракция фракций, определение радиоактивности суммарных РНК, суммарных белков и белков группы S-100 в экстрактах нейрональных и глиальных фракций проводили, как описано ранее [5].

В электрофизиологических экспериментах 100 мкл антисыворотки к белку S-100 или немнунной сыворотки вводили в левый боковой желудочек мозга кроликов (взрослые самцы массой 2,5—3 кг) гамилтоновским микрошприцем через небольшое трепанационное отверстие. Активность нейронов исплатерального гиппокампа (поле CA₃) регистрировали экстраклеточно стеклянными микроэлектродами, заполненными 3 М раствором KCl, непосредственно в ходе обучения мятко фиксированных животных. Для подведения микроэлектродов использовали микроманипуля-

тор, крепившийся вместе с небольшим предусилителем на костях черепа кроликов. Активность нейронов записывали на магнитную ленту и затем переписывали на ленту самописца с соответствующей редукией скорости.

Обучение животных (формирование условного рефлекса) заключалось в предъявлении им условного сигнала (звуковой стимул 1000 Гц длительностью 6 с) и затем—безусловного электрокожного подкрепления (ток 24—27 В, 200 Гц, импульсы длительностью 0,1 мс, подававшиеся в течение 1 с). Обучение продолжалось в течение 2 дней после введения сывороток и состояло из 4—8 сеансов, проводившихся с интервалами в несколько часов.

Анализ нейрональной активности заключался в измерении межспайковых интервальных характеристик и построении гистограмм нейронной активности до, во время и после предъявления условных и безусловных стимулов. В работе использовали анализатор НТА-1024 («Метримпекс», ВНР). Эксперименты были выполнены на животных разных видов, принадлежащих к одному отряду (грызуны): на крысах был осуществлен достаточный для подробного биохимического анализа набор материала, тогда как детальный электрофизиологический анализ технически было возможно провести только на кроликах.

Результаты и обсуждение

Типичная динамика интервальных характеристик активности гиппокампальных нейронов, регистрировавшихся в ходе выработки условного рефлекса у интактных животных и кроликов, получавших инъекции неиммунной сыворотки, позволила выделить три основных периода.

Первый период характеризовался тем, что получение животными безусловного электрокожного подкрепления индуцировало выраженную пачкообразную активность нейронов с доминирующими межспайковыми интервалами в области 1—45 и 100—200 мс; он наблюдался при получении животными первых 12 сочетанных предъявлений условных и безусловных стимулов.

Второй период отличался наличием регуляризованной пачкообразной активности гиппокампальных нейронов, индуцируемой предъявлением условных звуковых стимулов и продолжавшейся длительное время после получения животными безусловного электрокожного подкрепления. Эта форма активности появлялась после 12—18 предъявлений условных и безусловных сигналов.

Третий период наблюдался после 40—50 или более сочетанных предъявлений стимулов и сопровождался исчезновением пачкообразной активности и отсутствием заметных изменений в характере одиночной спайковой активности гиппокампальных нейронов в ответ на предъявление животному как условных, так и безусловных сигналов.

У кроликов, получавших инъекции антисыворотки к белку S-100, выработка условного рефлекса характеризовалась той же самой дина-

микой изменений интервальных характеристик активности гиппокампальных нейронов. Однако длительность всех трех основных периодов у этих животных была существенно короче. Так, уже после предъявления животным 2—5 сочетаний условного и безусловного стимулов первый период сменялся вторым (период регуляризации). Второй период сменялся третьим (период торможения) после 12—15 предъявлений стимулов.

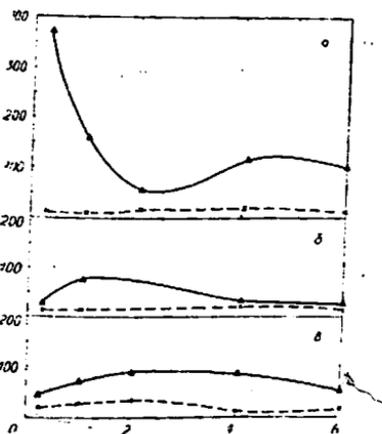


Рис. 1. Влияние антисыворотки к белку S-100 (а), неиммунной сыворотки (б) и «ложной инъекции» (в) на синтез эндогенных белков группы S-100.

мый из глимальной фракции;

Обозначения: —*— материал, экстрагируемый из глимальной фракции. По оси абсцисс—дни, прошедшие с момента инъекций; по оси ординат—радиоактивность соответствующего материала, выраженная в расп./мин/мг белка, в экстрактах соответствующих фракций

Отмена безусловного электрокожного подкрепления вела к угашению условного рефлекса и появлению вновь пачкообразной активности гиппокампальных нейронов с доминирующими интервалами в областях 1—45 и 100—200 мс. Возврат пачкообразной активности у интактных животных и кроликов, получавших инъекции неиммунной сыворотки, наблюдался после 6—8 изолированных предъявлений условного звукового стимула; животным, получавшим антисыворотку к белку S-100, для этого требовалось только 2—4 предъявления. После 28—30 изолированных предъявлений условного стимула контрольным животным и 6—11 животным, получавшим инъекции антисыворотки, пачкообразная активность гиппокампальных нейронов вновь сменялась одиночными разрядами клеток без заметных изменений средних межспайковых интервалов.

Таким образом, можно полагать, что введение животным антисыворотки к мозгоспецифическим белкам группы S-100 сопровождается в сравнении с контрольными животными существенным ускорением как процессов формирования (в 4—6 раз), так и угашения сформированных (в 3—5 раз) условных рефлексов. Эти электрофизиологические данные находятся в хорошем соответствии с результатами поведенческих экспериментов, установивших, что определенные дозировки γ -глобулинов к белку S-100 в 2—3 раза ускоряют процесс формирования у крыс инструментального питьевого поведения в камере Скиннера [3].

При анализе биохимических изменений, индуцируемых в нейронах и глиии головного мозга крыс антисывороткой в белку S-100, прежде всего отмечалось резкое (7—8-кратное) повышение содержания вновь синтезированного белка S-100 во фракции нейронов, но не глиии, наблюдаемое уже через 3 ч после инъекции. Ко 2-м суткам после воздействия содержание вновь синтезированного белка S-100 в нейрональной фракции снижалось до исходного уровня (рис. 1). Ни «сложная инъекция», ни инъекция немумунной сыворотки не вызывали заметных изменений его обмена.

Ни одно из данных воздействий не давало существенных изменений со стороны синтеза суммарных РНК и белков во фракциях нейронов или глиальных клеток. Можно лишь отметить некоторую тенденцию к интенсификации синтезов макромолекул, в основном, к 4-му дню после инъекций (рис. 2, 3), которую, вероятно, следует расценивать как отражение неспецифических репаративных процессов, имеющих место в ткани мозга в ответ на повреждающее воздействие самой процедуры инъекции, наркоза и т. п.

Основные выводы, вытекающие из полученных данных, заключаются в следующем.

Иммунные сыворотки (антитела), вводимые в желудочки мозга животных, обладают способностью к весьма быстрому и достаточно генерализованному проникновению в паренхиму ткани мозга. Иначе трудно объяснить тот факт, что антисыворотка к белку S-100 уже через 3 ч после инъекции (возможно, и ранее) вызывает выраженные изменения со стороны обмена белков S-100 в суммарных популяциях глиии и нейронов головного мозга животных и оказывает влияние на общую функциональную активность мозга, связанную с формированием разных видов поведенческих навыков [1, 3].

Исходя из мнения о преимущественно внутриклеточной (цитоплазматической) локализации белков группы S-100 [6], можно заключить, что вводимые антитела способны достигать и взаимодействовать с внутриклеточными антигенами-мишенями (возможно, за счет пиноцитоза, весьма активного в нервных клетках) [7]. Этот вывод согласуется с данными о проникновении антирибонуклеопротеиновых антител внутрь живых клеток, полученных в модельных системах [8], а также с результатами экспериментов по изучению жизнедеятельности нейронов при воздействиях на них антисыворотки к внутриклеточным ферментам-антигенам [9].

Данные о приблизительно 2-дневных изменениях со стороны обмена белка S-100, сопровождающих однократную инъекцию антисыворотки к нему, позволяют заключить, что длительность специфического (первичного, зависящего от взаимодействия молекул антител с соответствующими антигенами-мишенями), по-видимому, исчисляется часами или несколькими сутками. Более поздние и длительные изменения со стороны поведения и других физиологических показателей, индуцированные вводимыми в мозг антисыворотками, отмечавшиеся в ряде работ [10],

вероятно, связаны не столько с первичными иммунологическими нарушениями функционирования антигенов-мишеней, сколько с какими-либо последующими метаболическими событиями, обусловленными иммунологическими нарушениями.

Специфические иммунологические воздействия *in vivo* могут сопровождаться резким усилением синтеза соответствующих антигенов-мишеней. Вероятно, это отражает включение определенных гомеостатических компенсаторных механизмов, функционирующих по принципу отрицательной обратной связи. При этом может наблюдаться временная функциональная гиперкомпенсация соответствующих систем; иными словами, воздействие антисыворотки не только не вызывает ингибирование функциональной гиперкомпенсации системы антигенов, но, напротив, приводит к стимуляции ее функций (подобное предположение было выдвинуто Н. И. Мечниковым еще в начале нашего столетия) [11].

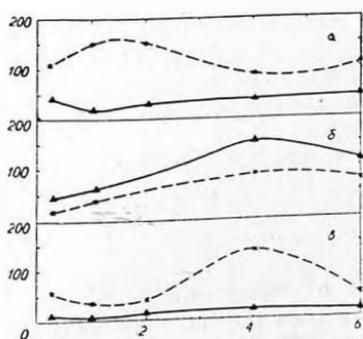


Рис. 2.

Рис. 2. Влияние антисыворотки к белку S-100 (а), неиммунной сыворотки (б) и «ложной инъекции» (в) на синтез суммарных РНК. Обозначения те же, что и на рис. 1.

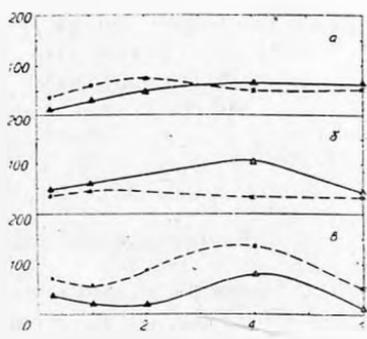


Рис. 3.

Рис. 3. Влияние антисыворотки к белку S-100 (а), неиммунной сыворотки (б) и «ложной инъекции» (в) на синтез суммарных белков. Обозначения те же, что и на рис. 1, 2.

Примечание. Каждая точка на графиках представляет соответствующее суммарное значение радиоактивности, полученное при забое трех животных.

Полученные данные о стимулирующем влиянии антисыворотки к белку S-100 на его накопление в нейрональной, но не в глиальной фракции, служат, на наш взгляд, еще одним свидетельством в пользу представлений о тесном функционально-метаболическом взаимодействии между нейронами и глиальными клетками [12], проявляющемся, в частности, в транспорте молекул S-100, синтезируемых, по-видимому, исключительно глиальными клетками [6], в близлежащие нейроны.

Иммунные воздействия, применявшиеся в наших экспериментах, влияющие на синтез и/или транспорт вновь синтезированного *de novo* белка S-100 из глии в нейроны, в совокупности с полученными физиологическими данными позволяют полагать, что эти события, происходя-

щие на молекулярном уровне, имеют отношение к процессам обучения и памяти. Причем, применяя разные дозировки и концентрации антисывороток к белку S-100, а также используя разные поведенческие ситуации, по-видимому, можно оказывать рационально направленные модулирующие влияния на эффективность процессов обучения [1, 3].

Заключение, сделанное на основе полученных экспериментальных данных, несомненно, может рассматриваться только как ориентировочное и рабочее, так как оно основано на анализе ограниченного числа физиологических и биохимических параметров и описывает физиологические и молекулярные аспекты действия антисыворотки, направленной на один из типов мозговых антигенов. Несомненно, для более надежного и обоснованного суждения о возможностях и последствиях применения иммунологических воздействий в нейрофизиологии необходимы дальнейшие расширенные исследования.

IN VIVO EFFECT OF ANTISERUM TO BRAIN-SPECIFIC PROTEINS OF S-100 GROUP ON THE SYNTHESIS OF MACROMOLECULES IN RAT BRAIN NEURONS AND GLIA AND ON BIOELECTRIC ACTIVITY OF RABBIT HIPPOCAMPAL NEURONS

ZHURAVLEV B. V., MIANI N., MIKKETTI E., DONATO R., POLETAYEV A. B.

P. K. Anokhin Institute of Normal Physiology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

Institute of Normal Anatomy, Rome Catholic University, Italy

Intraventricularly injected antibodies to S-100 protein in several hours spread through the whole brain, penetrate into cells and crossreact with antigen-targets, altering their function. The primary effect of antibodies caused by changes in antigen-targets are long-lasting (hours or days); the lag effects are due to secondary changes in metabolism. It's supposed that perhaps the transport of S-100 protein from glia where it's synthesized to neurons has something to do with the processes of training and memory. Thus immunological influences altering synthesis of the brain-specific S-100 type proteins may either stimulate or suppress the elaboration of new habits.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hyden H., Langle P. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64, 4, 1959—1961, 1970.
2. Казначеев В. П., Штрук М. Б. Успехи физиол. наук, 2, 1, 70—81, 1971.
3. Юркевич С. О., Полегаев А. Б. Журн. высш. нерв. деят.-сти, 32, 1, 79—85, 1982.
4. Cocchia D. Cell a. Tissue Res., 214, 3, 529—540, 1981.
5. Полегаев А. Б., Миани Н., Микетти Ф., Донато Р. Биохимия, 11, 1820—1825, 1983.
6. Chandour M. S., Langley O. K., Labourdette G., Vincendon G., Gombos G. Dev. Neurosci., 4, 1, 66—78, 1981.
7. Sparrow J. Brain Res., 212, 1, 159—163, 1981.
8. Alarcon-Segovia D., Ruiz-Arguelles A., Lorente L. J. Immunol., 5, 1855—1862, 1979.

9. *Costa M., Geffen L. B., Rush R. A., Bridges D., Blessing W. W., Heath J.* Brain Res., 173, 1, 65—78, 1979.
10. *Jancovic B. D., Raic L., Vescov R., Horvat J.* Nature, 215, 5138, 270—271, 1968.
11. *Семенов С. Ф., Попова Н. Н.* Неврологические и психиатрические болезни с точки зрения иммунопатологии мозга, М., Медицина, 1969.
12. *Шелихов В. Н., Дерючев В. В., Полетаев А. Б., Наумова Т. С.* Успехи физиол. наук, 6, 3, 90—109, 1975.

Поступила 21. III 1983