

УДК 612.82.821.2

НЕКОТОРЫЕ НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯТЫ УЧАСТИЯ ГИППОКАМПА МОЗГА КРЫС В УСЛОВНОРЕФЛЕКТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Чоговадзе И.С., Микеладзе Д.Г.

*Институт физиологии им. И.С.Бериташвили АН
ГССР, Тбилиси*

Проведено количественное определение некоторых пептидов, катехоламинов, серотонина и ГАМК, а также чувствительности рецепторных белков в гиппокампе мозга крыс после обучения животных реакции активного избегания в челночной камере. Выяснено, что при обучении происходит увеличение концентрации Арг-вазопрессина и серотонина и снижение дофамина, ГАМК, субстанции Р и β -эндорфина. Кроме того, было найдено, что увеличивается плотность D_2 -дофаминового и ГАМК-рецепторов и уменьшается число мест связывания для лигандов М-холинорецептора. Показано, что обучение животных сопровождается повышением активности сАМР- и Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеинкиназ. Делается заключение, что при обучении крыс происходит усиленный обмен АХ в гиппокампе, который регулируется тормозящими ГАМК-, дофамин- и пептидергическими интернейронами, проецирующимися из септальной области мозга.

* * *

В настоящее время выяснено, что лимбические структуры мозга, и в особенности септо-гиппокампальная область, участвуют в различных поведенческих реакциях крыс [1, 2]. Морфологическими, физиологическими и фармакологическими исследованиями было найдено, что ингибирование нейрональной активности гиппокампа или изоляция этой структуры от септума (денервация) приводят к полной или частичной потере поведенческих реакций [3]. Предполагается, что специфические изменения трансмембранного потенциала пирамидальных клеток гиппокампа, выражающиеся в длительной потенциации и запускающиеся афферентами из септума, могут лежать в основе синаптической пластичности, в записывании и хранении информации [4]. Показано, что в синаптических контактах септо-гиппокампальных нейронов принимают участие АХ [5], глутаминовая кислота [6], дофамин [7], ГАМК [8], субстанция Р и β -эндорфин [5]. В этой сложной иерархии регуляции физиологической активности гиппокампа ведущее значение имеют соответствующие рецепторные системы, их модуляция и регуляция, которые трансдуцируют синаптический сигнал и в конечном итоге обуславливают длительные биохимические изменения.

В настоящей работе изучены количественные сдвиги катехоламинов и некоторых пептидов в гиппокампе, изменение чувствительности определенных рецепторных систем, а также активностей основных протеинкиназ в процессе обучения и условнорефлекторной деятельности.

Материалы и методы

Опыты проводили на растущих крысах-самцах массой 100-120 г. Реакцию активного избегания животных вырабатывали по методу, описанному Айвазашвили, Иорданишвили [9] в челночной камере с помощью светового сигнала и электрического раздражения. Для улучшения условно-рефлекторной деятельности к пище добавляли оротовую и инозиновую кислоты, а также витамины по методу, описанному ранее [10]. В качестве контрольных использовали крыс, получавших тот же рацион питания.

Синаптические мембраны выделяли по методу Whittaker [11]. Связывание различных лигандов с рецепторными белками определяли в среде, содержащей 120 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 1,2 мМ CaCl₂, 1,3 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-HCl, pH 7,4, 10 мМ паргиллина. При определении плотности дофаминового рецептора инкубационная среда содержала от 0,5 до 10 нМ [³H]спироперидола, рецепторов ГАМК — от 0,5 до 15 нМ [³H]мусцимола, мускаринового холинорецептора — от 1 до 15 нМ [³H]квиниклидинилбензилата и β-адренорецептора — от 0,7 до 10 нМ [³H]дигидроальprenолола. Для определения неспецифического связывания использовали 10 мкМ сульпирида (D₂-дофаминовый рецептор), 100 мкМ ГАМК (ГАМК-рецептор), 10 мкМ пропранолола (β-адренорецептор) и 10 мкМ атропина (мускариновый холинорецептор). В опытах использовали по 0,4 мг/мл белка. Инкубирование проводили в течение 25 мин при комнатной температуре, и смесь фильтровали через фильтры GF/C («Whatman», Англия). Фильтры промывали 20 мл буфера и радиоактивность считали в толуольной сцинтилляционной смеси.

Протеинкиназную активность определяли по методу Johnson и соавт. [12]. В соответствующих опытах добавляли либо 10 мкМ сАМР (сАМР-зависимая протеинкиназа), либо 10 мкМ CaCl₂ и 25 мкг/мл кальмодулина (Ca²⁺-кальмодулинзависимая протеинкиназа). Количество биогенных моноаминов (серотонин, дофамин, норадреналин) и ГАМК определяли с помощью дансил-derivатизации и ТСХ по методу, описанному ранее [10].

Определение пептидов проводили с помощью хроматографа высокого давления фирмы «Millipore-Waters» (США). Образцы ткани кипятили в 5 объемах воды в течение 3 мин, гомогенизировали и добавляли равный объем 0,1%-ной трифторуксусной кислоты (ТФУ). Смесь инкубировали в течение часа при 37°, центрифугировали при 20000 g 40 мин и надосадочную жидкость пропускали через колонку Ser-Pak («Millipore-Waters», США). Пептиды элюировали 60%-ным раствором ацетонитрила, содержащим 0,05% ТФУ. Элюаты выпаривали досуха на приборе Pico-Tag («Millipore-Waters», США), разводили в 200 мкл 0,05% ТФУ и вводили в систему ВЭЖХ (50—100 мкл). Использовали колонку Nova Pac C₁₈ (RP) (3,9 × 150 мм; «Millipore-Waters», США). Элюирование проводили линейным градиентом ацетонитрила от 0 до 42% со скоростью 0,5 мл в мин. Пептиды детектировали на спектрофотометре 441 («Millipore-Waters», США) при длине волны 214 нм. Количественную обработку хроматограмм проводили на интеграторе Chromatorac C-R2AX («Shimadzu», Япония). Стандартизацию колонки проводили следующими пептидами: Arg-вазопрессин, Leu- и Met-энкефалины, окситоцин, брадикинин, ангиотензин II,

нейротензин, холецистокинин (сульфатированный), субстанция Р, соматостатин, вазоактивный интестинальный пептид, АКГГ₁₋₃₉, β -эндорфин.

Результаты и обсуждение

Исследованиями, проводившимися ранее в нашей лаборатории [13] было выяснено, что условнорефлекторная деятельность животных, способность к обучению, стимулируется определенными метаболитами и зависит от дополнительных факторов питания. Поэтому для усиления поведенческой активности животных в рацион питания как контрольных, так и подопытных животных дополнительно вводили различные коферменты, а также предшественники нуклеиновых кислот в виде оротовой и инозиновой кислот [10].

В настоящее время выяснено, что моноамины мозга (норадреналин, дофамин, серотонин) принимают участие в процессах обучения, консолидации и воспроизводства информации. Показано, что изменения метаболизма этих нейромедиаторов касаются не основных катехоламин- или серотонинергических структур мозга, а происходят на уровне определенных нейрональных путей, способствующих усилению процессов запоминания [14]. Предполагается, что эти пути регулируются некоторыми нейропептидами [15], усиливающими обмен моноаминов и модулирующими рецепторные системы указанных нейромедиаторов.

Количественное определение катехоламинов и серотонина в гиппокампе показало, что у обученных животных происходило снижение содержания дофамина, а количество норадреналина и серотонина оставалось на одном уровне (табл. 1). Эти изменения были характерны для септо-гиппокампальной области и не происходили в других исследуемых нами структурах мозга: кора гемисфер, мозжечок, продолговатый мозг (непредставленные данные). Аналогичная картина наблюдалась и в отношении ГАМК, уровень которой снижался у животных в гиппокампе после обучения.

Таблица 1

Изменение содержания биогенных моноаминов и ГАМК (мкг/г ткани) в гиппокампе мозга крысы после обучения условно-оборонительной реакции

Условия опыта	Норадреналин	Дофамин	Серотонин	ГАМК
Контроль	$0,33 \pm 0,03$	$1,22 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,04$	$5,56 \pm 0,87$
После обучения	$0,21 \pm 0,04$	$0,58 \pm 0,03$	$1,23 \pm 0,12$	$1,92 \pm 0,14$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 и 4 приведены средние данные из 6 опытов ($p \leq 0,05$).

Соответственно изменялась лигандсвязывающая способность рецепторных систем дофамина и ГАМК (табл. 2). На фоне уменьшения количеств этих нейромедиаторов происходило повышение числа мест связывания соответствующих лигандов, что свидетельствовало о включении регуляторных механизмов рецепторных систем в ответ на уменьшение содержания агонистов. Повышение плотности дофаминовых и ГАМК-рецепторов свидетельствует о вовлечении этих рецепторов гиппокампа и соответствующих нейромедиаторов в формировании и закреплении

следов памяти. Кроме этого было обнаружено, что при обучении происходит уменьшение плотности мускариновых холинорецепторов, обусловленно-го, по-видимому, увеличением количества АХ в гиппокампе.

Таблица 2

Изменение лигандсвязывающей способности (в фмоль/мг и Kd, в нМ) β -адрено-, М-холино-, Д-дофаминового и ГАМК-рецепторов гиппокампа крыс после обучения животных условнооборонительной реакции

Условия опыта	β -адренорецептор		Д-дофаминовый ре- цептор		ГАМК-рецептор		М-холинорецептор	
	B_{max}	Kd	B_{max}	Kd	B_{max}	Kd	B_{max}	Kd
Контроль	99,4	1,72	35,4	0,82	51,7	1,18	104	4,4
После обучения	101,1	1,27	64,8	1,27	161,9	1,28	25	3,2

Следует отметить, что усиление обмена АХ в гиппокампе является основным коррелятом условнорефлекторной деятельности крыс [5]. Показано, что метаболизм АХ в клетках гиппокампа находится под контролем нервных путей, проецирующихся из септума через опиятные, ГАМК- и дофаминергические интернейроны, а также нейроны, использующие в качестве нейромедиатора субстанцию Р [8]. ГАМК-содержащие интернейроны оказывают тормозящее действие и снижают интенсивность обмена АХ в вентральной части гиппокампа. Со своей стороны эти интернейроны активируются дофаминергическими путями из септума и в конечном итоге также вызывают ингибирование обмена АХ в гиппокампе, а также снижение условнорефлекторной активности [16]. Полученные нами данные указывают на то, что при обучении условно-оборонительной реакции у крыс происходит снижение активности дофаминовых, а соответственно и ГАМК-содержащих интернейронов, что приводит к снятию тормозящего действия последних на обмен АХ в гиппокампе.

Другими важнейшими соединениями, регулирующими активность гиппокампа, являются пептиды. Показано, что широкий спектр этих соединений вовлечен в процесс обучения и памяти [17]. Изменения условнорефлекторной деятельности животных под действием некоторых пептидов в основном затрагивают лимбические структуры мозга и тесно связаны с метаболизмом биогенных моноаминов. Предполагается, что одним из анатомических субстратов поведенческих и нейрохимических эффектов вазопрессина, АКТГ и его фрагментов, субстанции Р и β -эндорфина может быть гиппокамп [18].

Таблица 3

Изменение содержания некоторых неuropeптидов (пмоль г ткани) в гиппокампе крыс после обучения животных условно-оборонительной реакции

Условия опыта	β -эндорфин	субстанция Р	Arg-вазопрессин
Контроль	$3,3 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,08$	$1,8 \pm 0,2$
После обучения	$1,3 \pm 0,2$	$0,08 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,3$

Количественный анализ некоторых неuropeптидов в гиппокампе с помощью ВЖЭХ показал, что при закреплении условно-оборонительной реакции происходит снижение содержания субстанции Р и β -эндорфина

и повышение Arg-вазопрессина (табл. 3). Концентрации остальных определенных нами пептидов либо не изменялись (АКТГ₁₋₃₈, соматостатин), либо не детектировались вообще (брадикинин, нейротензин, холецистокинин₁₋₈).

Учитывая, что β -эндорфин также, как и дофамин, действует через ингибиторные ГАМК-ергические интернейроны, а субстанция Р непосредственно снижает обмен АХ в дорзальной части гиппокампа [16], можно заключить, что уменьшение количества этих пептидов, наряду с понижением содержания дофамина и ГАМК, вызывает снятие действия тормозных механизмов гиппокампа при обучении.

Сдвиги в содержании указанных выше нейротрансмиттеров и чувствительности рецепторных белков должны приводить к изменению систем внутриклеточной регуляции, к активации ряда ключевых ферментов, участвующих в посттрансляционной модификации. Определение сАМР-зависимой и Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы в гиппокампе показало, что в процессе обучения происходит выраженное изменение активности кальмодулинзависимого фермента (табл. 4). Активность же сАМР-зависимой протеинкиназы изменяется лишь в незначительной степени.

Таблица 4

Изменение активностей сАМР- и Ca^{2+} -сАМ-зависимой протеинкиназ (имод. Р, мкМ) в гиппокампе крыс после обучения животных условно-оборонительной реакции

Условия опыта	сАМР-зависимая протеинкиназа	Ca^{2+} -сАМ-зависимая протеинкиназа
Контроль	2898	1177
После обучения	4025	5445

Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа является ключевым ферментом, регулирующим обмен кальция в нервной ткани. Региональное и количественное распределение этого фермента в мозгу, особенности его регуляции позволяют предположить, что Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа может участвовать в фиксировании информации на молекулярном уровне и обуславливать функциональные изменения, связанные с синаптической пластичностью [19,20]. Учитывая тот факт, что ионы кальция опосредуют основные физиологические феномены гиппокама, в том числе и длительную потенциацию [4], можно предположить, что увеличение активности Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы сопряжено с усилением метаболической активности этой структуры и коррелирует с повышением способности запоминания.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что обучение крыс условнорефлекторному поведению сопровождается повышением метаболической активности гиппокампа через дофамин-ГАМК-холин и пептидергические системы, которые в конечном итоге приводят к усилению Ca^{2+} -зависимых процессов, возможно, лежащих в основе восприятия информации и закрепления следов памяти.

SOME NEUROCHEMICAL CORRELATES OF CONDITIONED REFLEX REACTION ACTIVITY IN RAT BRAIN HIPPOCAMPUS

Chogovadze I. S., Mikeladze D. G.

*Beritashvili Institute of Physiology, Academy of Sciences the
Georgian SSR, Tbilisi*

Determination of some active peptides, biogenic amines, GABA as well, as the sensitivity of some receptors in rat brain hippocampus was carried out after active avoidance paradigm in shuttle-box. It was obtained that training evokes arg-vasopressin and serotonin concentrations enhancement. In contrast to that the amount of dopamine, GABA, substance P and β -endorphin decreases after the training. Besides, D_2 -dopamine and GABA receptor density rise and amount of binding sites fall for M-cholinoreceptor ligands was observed. It was shown that training of animals was accompanied by cAMP- and Ca-calmodulin-dependent protein kinase activity amplification. It is proposed, that training induces the intensification of acetylcholin metabolism, regulated by inhibitory GABA-, dopamine- and peptidergic interneurons projecting from septal regions of brain.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кругликов Р.И. Нейрохимия механизмов обучения и памяти, М., Наука, 1981.
2. Matthies H. - In: Neuronal Plasticity and Memory Formation (eds. C.Ajmoné Marsan, H. Matthies), v.9, p.1-15, Raven Press, N-Y., 1982.
3. Grossman S.P. - In: Functions of the Septo-hippocampal System (eds. K. Elliot, J. Whelan), p.227-273, Elsevier/Nort-Holland, N-Y., 1978.
4. Lynch G., Larson J., Kelso S., Barrionuevo G., Sotthoff F. Nature, v.301, p.603-604, 1983.
5. Costa E., Panula P., Thompson H.K., Cheney D.L. Life Sci., v.32, p.165-179, 1983.
6. Collingridge G.L. Trends Pharmacol. Sci., v.6, p.407-411, 1985.
7. Greckch G., Matthies H. - In: Neuronal Plasticity and Memory Formation (eds. C.Ajmoné Marsan, H. Matthies), v.9, p.353-359, Raven Press, N-Y., 1982.
8. Panula P., Revalta A.V., Cheney D.L., Wu J.Y., Costa E.J. Comp. Neurol., v.222, p.69-80, 1984.
9. Айпазашвили И.М., Иорданишвили Г.С. Сообщения АН ГССР, т.81, №1 с.181-184, 1976.
10. Чоговадзе И.С. Известия АН ГССР, Актуальные вопросы биологии и медицины, с.459-466, 1988.
11. Whittaker V.P., Ann. N. Y. Acad. Sci., v.137, p.952-960, 1966.
12. Johnson E.M., Maeno H., Greengard P.J. Biol. Chem. v.246, p.7731-7739, 1971.
13. Коменгачи П.А., Алексидзе Н.Г., Клейн Е.Э. — В кн: Нейрохимические аспекты памяти, Тбилиси, Мецниереба, 1980.
14. Kovacs G.L., Bohus B., Versteeg D.H.G. Progr. Brain Res. v.53 p.123-140, 1980.
15. Bohus B.L., Conti G.L., Kovacs G.L., Versteeg D.H.G. — In: Neuronal Plasticity and Memory Formation (eds. C.A. Marsan, H. Matthies), v.9, p.75-87, Raven Press, 1982.
16. Blaker W.D., Peruzzi G., Costa E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.81, p.1880-1882, 1984.
17. Кругликов Р.И. — В кн: Фармакология нейропептидов, с.112-124, 1982.
18. Wimersma Greidanus T.J.B., Bohus B., Kovacs G.L., Versteeg D.H.G., Burbach J.P.H., De Wied D. Neurosci. Behav. Rev. v.7, p.453-463, 1983.
19. Quinnet C.C., McGuinness T.L., Greengard P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.81, p.5604-5608, 1984.
20. Miller S.G., Kennedy M.B. Cell., v.44, p.861-870, 1986.

Поступила 13.04.1989