



ИЗМЕНЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СИНАПТОСОМНЫХ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЦЫПЛЕНКА В ПРОЦЕССЕ ИМПРИНТИНГА

КЛЕПН Е. Э., ГВАЛНИЯ Н. В.

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

С целью изучения биохимического механизма импринтинга— своеобразной формы долговременной памяти—было проведено исследование количественных изменений фракций синапсомных белков переднего мозга цыпленка. Выявлена группа фракций, величина которых возростала при импринтировании. Произведено сравнение с изменением аналогичных фракций в мозгу крысы при формировании другого вида памяти—условно-рефлекторной. Отмечено наличие как сходства, заключающегося в количественном увеличении аналогичных фракций, так и некоторых различий, указывающих на особый путь синтеза белков в случае импринтинга.

Импринтинг—своеобразная, самая ранняя форма долговременной памяти, имеющая большое биологическое значение, как необходимое условие сохранения вида. Механизм его еще мало изучен. Явление импринтинга (запечатления), как известно, заключается в том, что новорожденный детеныш быстро и прочно запоминает первый же предмет (любой формы), движущийся в поле его зрения, и неуклонно следует за ним, как за матерью. Вначале эта способность приписывалась только некоторым видам животных, у которых она наиболее четко проявляется: выводковым птицам и некоторым копытным. Но позднее она была обнаружена, более или менее выражено, почти у всех животных, вплоть до приматов. Однако наиболее удобным объектом изучения этого явления, не затмененного другими поведенческими реакциями, остаются птенцы выводковых птиц—цыплята и утята [1, 2].

Ранее импринтинг изучался только физиологами, которые разработали лабораторные приемы его исследования: предложив вначале так называемый аппарат Гесса, представляющий собой огражденную дорожку для передвижения птенца вслед за перемещением импринт-объекта («манеж»), затем стали применять и другие приемы импринтирования [2—5].

В настоящее время выполнен ряд исследований, посвященный раскрытию биохимического механизма этого вида памяти [4—13].

Благодаря этим исследованиям были выяснены следующие вопро-

сы. 1). Процесс импринтирования связан с активацией синтеза ДНК и белков, в том числе двух белков, специфических для проведения нервного импульса: ацетилхолинорецептора (АХР) и АХЭ [7—11]. 2) Эта активация происходит в определенных областях мозга цыпленка, расположенных, главным образом, в стриатуме (полосатом теле). Ногн указывает, что основными зонами запоминания являются область в вентральном гипостриатуме, названная им *intermediate hyperstriatum ventrale* (IMHV), а также близрасположенная область, именуемая «участком S» [11]. 3) Специфичность областей мозга проверяли опытами по влиянию их повреждения на успешность импринтирования [11]. 4) Существенным является наблюдение об асимметрии полушарий в отношении биохимических сдвигов при импринтировании [10, 11]. 5) Помимо указанных изменений в интенсивности синтеза белков, некоторыми авторами отмечаются сдвиги в биосинтезе и других соединений, например, некоторых биогенных аминов [13].

По современным представлениям, в основе возникновения долговременного следа памяти лежит формирование определенного ансамбля нейронов, что связано с активацией синтеза некоторых специфических и неспецифических ферментных и рецепторных белков [14—17]. Поэтому имеются основания допустить, что этот процесс наиболее выражен в областях синаптических контактов. Ранее нами было показано, что при обучении крыс обнаруживается группа синаптосомных белков, количество которых при обучении увеличивается. В этой группе показано наличие АХР, а также выявлена возможность присутствия и других рецепторов [18—20].

При исследовании импринтинга, являющегося одной из форм долговременной памяти, можно было ожидать изменения аналогичных белковых фракций. Поэтому мы и предприняли их изучение, применив для выделения этих белков те же седиментационные и электрофоретические приемы, что и при исследовании мозга крыс.

Материалы и методы

Яйца кур инкубировали при 37—38°. Цыплят сразу после вылупления изолировали в отдельные коробки и содержали при 30°. Через 15—20 ч после вылупления они импринтировались в аппарате Гесса с манежем диаметром 1 м. В качестве импринт-объекта был применен полупрозрачный полиэтиленовый сосуд красного цвета с лампочкой от карманного фонарика внутри, который вращался вдоль дорожки манежа. После 5—7-кратного прохождения (или пробега) цыпленка вслед за объектом происходило прочное его запоминание, что проверяли тестированием на второй день. Был применен так называемый «световой» контроль. Цыплят того же возраста помещали по одному в тот же манеж (но без импринт-объекта) приблизительно на то же время, которое было затрачено на обучение. Освещение—как при импринтировании—рассеянный свет сверху. Затем обученных и контрольных цыплят помещали поодиночке в коробки и содержали при 25°.

На второй день (после тестирования) цыплят забивали, из полушарий переднего мозга методами дифференциального центрифугирования в градиенте сахарозы выделяли фракцию синаптических мембран [18—20]. Белки экстрагировали 1%-ным тритоном X-100 и подвергали электрофорезу в ПААГ тремя способами: 1) электрофорез в боратном буфере при pH 8,6; 2) электрофокусирование в градиенте pH

4.0—9.5; 3) способ, удачно заменяющий довольно сложный метод двумерного разделения, заключающийся в том, что из фореграммы, полученной при электрофорезе в боратном буфере рН 8,6, вырезается область, требующая дальнейшего разделения. Полученный «ломтик» гомогенизируется и гомогенат наносится на трубку с ПААГ для электрофокусирования [21], то есть двумерному разделению подвергается только требуемая фракция.

Полученные фореграммы денситометрировали и определяли площадь под пиками обычными методами.

Результаты и обсуждение

Для представления о характере распределения фракций белков синаптических мембран переднего мозга цыпленка в контроле и его изменении при импринтинге на рис. 1 приведены денситограммы одного из опытов. Из этого рисунка видно, что основная масса белков распо-

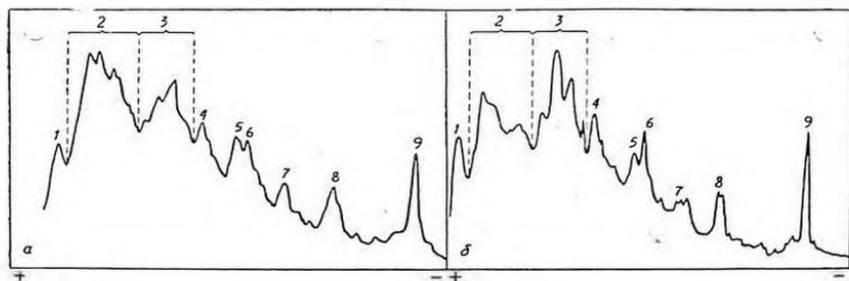


Рис. 1. Фракционирование белков трилонового экстракта синаптических мембран переднего мозга цыпленка путем электрофореза в ПААГ в боратном буфере, рН 8,6: а—контроль, б—импринтинг.

лагается в катодной части фореграммы в двух группах фракций: второй и третьей. Остальные белки сосредоточены в семи небольших фракциях. Разница между группами второй и третьей всегда четкая, но внутри этих групп количество пиков и границы между ними не всегда различаются. Видимо, эти белки близки по своей электрофоретической подвижности. Для количественной оценки были рассмотрены не отдельные пики, а указанные группы целиком. После импринтирования происходят количественные сдвиги: визуально заметно, что наиболее значительны изменения в упомянутых двух группах.

Количественная оценка и статистическая обработка данных приведена в таблице, из которой видно, что, действительно, достоверные изменения, связанные с импринтингом, происходят во второй и третьей группах. На 6,0% увеличивается третья группа и одновременно, почти на ту же величину (на 5,8%) уменьшается менее подвижная вторая группа. Величина остальных фракций достоверно не меняется. Необходимо учесть, что приведенные в таблице величины количественных изменений фракций кажутся незначительными только потому, что выражают процент от общего количества белков, то есть группа 3, составляющая 22,6%, увеличивается до 28,6%, а группа 2 уменьшается с 34,9% до 29,1%. Таким образом, по отношению к величине самой

фракции, сдвиги представляются весьма значительными—они составляют 1/4 и 1/6 исходной величины фракции. Изменения эти всегда однонаправлены и достоверны: $p_2 < 0,05$, а $p_3 < 0,02$.

Таблица

Изменение величины электрофоретических фракций белков синаптических мембран переднего мозга цыпленка при импринтинге электрофорез триптонового экстракта в боратном буфере рН 8,6)

Условия опыта	№№ фракций								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Контроль (I)	5,0 ±1,1	34,90 ±1,14	22,6 ±1,0	11,1 ±0,7	6,10 ±0,33	6,8 ±0,7	4,00 ±0,41	3,50 ±0,38	3,90 ±0,31
Импринтинг (II)	6,0 ±1,4	29,10 ±1,36	28,60 ±1,28	10,70 ±0,59	5,90 ±0,33	6,90 ±0,16	3,90 ±0,41	3,3 ±0,4	3,60 ±0,71
Разность II—I	1,0	-5,8 $p < 0,05$	6,0 $p < 0,02$	-0,4	-0,2	0,1	-0,1	-0,2	-0,3

Примечание. Изменения всех фракций, кроме 2- и 3-й, недостоверны $p > 0,2$

При сравнении вышеописанных наблюдений с результатами наших прежних исследований (изучение синаптосомных белков мозга крыс при выработке условно-рефлекторной памяти) выявили, с одной стороны, их сходство, заключающееся в том, что при обучении крыс также происходило нарастание электрофоретически аналогичных фракций и примерно на ту же величину—с 19,5 до 25,1% [20], но, с другой стороны, в опытах с крысами это увеличение происходило гораздо медленнее: за 7—10 дней обучения и, вместе с тем, не наблюдалось достоверного уменьшения какой-либо другой фракции.

Сопоставление отличий в изменении аналогичных белковых фракций при двух видах памяти с хорошо известным своеобразием импринтинга, по-видимому, свидетельствует об особенностях пути белкового синтеза при формировании данного вида памяти.

Своеобразные черты импринтинга, отличающие его от других форм памяти, заключаются в следующем: 1) запоминание совершается только в первоначальный очень короткий период постнатальной жизни (до 30 ч) при функционально неразвитом мозге (это последнее обстоятельство специально подчеркивается исследователями—мозг морфологически уже сформирован, но функционально не развит [7, 11]); 2) период обучения очень короткий—около 1 ч; 3) обучение сопровождается сильным эмоциональным напряжением, а также, как отмечают некоторые исследователи [6], более быстрым развитием мозга; 4) импринтинг биологически особенно необходим для сохранения вида. Короче говоря, при формировании энграммы импринтинга крайне необходимо в кратчайшие сроки создать множество разнообразных белков. Как же эта задача выполняется еще недоразвитым организмом?

В литературе встречаются указания на возможность в некоторых

случаях ускоренного синтеза белков путем быстрой активации так называемых «белков-предшественников», то есть заранее синтезированных физиологически неактивных «заготовок» [22]. Сообщается, что это происходит, например, в случае необходимости быстрого синтеза в организме трипсина и инсулина: из «предшественников» — трипсиногена и проинсулина, представляющих собой длинные полипептидные цепи, не обладающие ферментной активностью. Под действием же протеазы быстро «отстригается» часть полипептидной цепи, что вызывает появление специфической активности.

Гипотеза об участии подобного механизма в импринтинге была предложена Haywood и соавт. [8], которые, обнаружив быстрое нарастание активности АХЭ при импринтинге, были вынуждены допустить, что белок был синтезирован *перед* импринтингом, а во время обучения за очень короткое время произошла его активация путем быстрой конформационной перестройки (пути активации, конечно, в случае разных белков могут быть разные).

Нам кажется правомерным допустить, что синтез и других белков, необходимых для развития импринтинга, может происходить таким же образом — путем быстрой конформационной перестройки предварительно синтезированного «предшественника». Возможность наличия у «предшественника» такого качества, как избыточная длина полипептидной цепи соответствовала бы нахождению их в более медленной электрофоретической фракции (как это имело место в наших опытах), которая должна была бы уменьшаться.

В случае правильности высказанного предположения становится объяснимым отсутствие фракции, уменьшающейся при обучении крыс (о чем было сказано выше), так как в этом случае особой необходимости в ускоренном формировании энграммы нет и синтез белков может происходить обычным путем.

В некоторой степени с нашими данными согласуются цитированные выше результаты Заалшвили [12], которая, исследуя изменения распределения фракций общих мембранных белков мозга цыпленка при импринтинге, также нашла уменьшение одной (тоже второй) фракции, занимающей сходное положение на денситограмме. Нужно учесть, однако, что ею исследовались синапсомные белки совместно с митохондриальными.

Из всего вышесказанного следует, что наше представление об особом «ускоренном» синтезе белков, необходимых для консолидации памяти при импринтинге, сложилось, главным образом, на основании умозрительных сопоставлений, которые, однако, кажутся нам достаточно убедительными. Для получения экспериментальных доказательств нужно выяснить природу исследуемых белков. Для этого, прежде всего, необходимо их более детальное разделение. Наиболее часто применяемым способом для достижения этой цели является двумерное разделение с использованием в качестве одного из направлений электрофокусирования, но оно дает настолько большое количество

отдельных фракций, что оценка денситограммы требует машинной обработки, а это пока затруднительно.

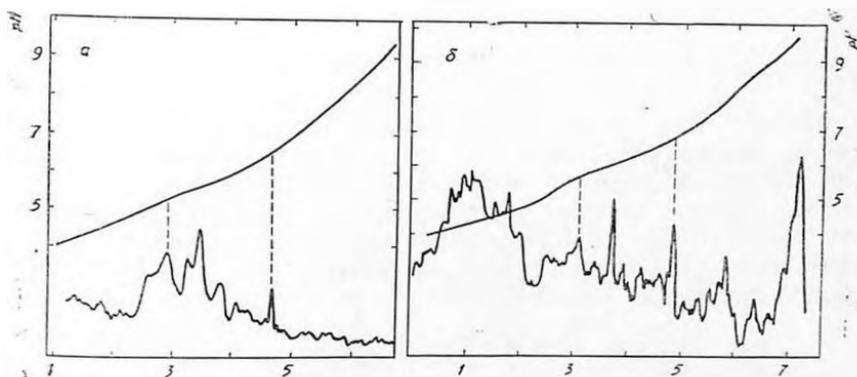


Рис. 2. Электрофокусирование в ПААГ трипсиновых экстрактов: а—экстракт участка фореграммы в ПААГ (денситограмма с которой дана на рис. 1. а), содержащего вторую и третью группы фракций (вторичное разделение этих белков), б—цельный экстракт белков синаптических мембран

Поэтому мы воспользовались методом, описанным выше (в разделе «Материалы и методы»), при помощи которого были подвергнуты электрофокусированию интересные нас фракции: вторая и третья [21]. Полученная при этом кривая (рис. 2, а) была сопоставлена с кривой электрофокусировки цельного экстракта синапсомембранных белков (рис. 2, б). Видно, что из множества пиков общего экстракта, интересующим нас группам белков принадлежит только восемь, расположенных между рН 5,5 и 6,8. Относительно крайнего пика (рН 5,5) можно предположить, что он является холинорецепторным белком, судя по литературным данным о величине изоэлектрической точки этого белка [23].

В дальнейшем предстоит изучить функциональные свойства остальных белков, представленных пиками указанной денситограммы (рис. 2, б). Учитывая данные, полученные Собчинской и соавт. [13], о накоплении при импринтинге некоторых биогенных аминов, можно ожидать наличия в этой группе фракций ферментных белков, связанных с метаболизмом этих аминов, и, кроме того, некоторых компонентов сАМР и Ca^{2+} -кальмодулиновой систем, которые присутствуют в синапсомембранных [17].

При изучении этого вопроса нельзя упускать из виду то обстоятельство, что, хотя с процессами памяти связана активация синтеза целого ряда белков, изменения, происходящие при обучении, связаны не только с запоминанием [11, 24], и для выявления последних могут потребоваться дополнительно специальные методы исследования.

CHANGES IN THE DISTRIBUTION OF BRAIN SYNAPTOSOMAL PROTEINS IN THE PROCESS OF IMPRINTING

KLEIN H. E., GVALIA N. V.

I. S. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi

To study the biochemical mechanism of imprinting quantitative changes in synaptosomal protein fractions in chicken forebrain have been investigated. A group of fractions was revealed the amount of which increased during imprinting. Comparison was made with the similar protein fractions in the rat brain during formation of another type of memory—conditioned-reflex memory. A difference was found, indicating a peculiar pathway of protein synthesis during imprinting.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Дьюбери Д. Поведение животных. Сравнительные аспекты, М., Мир, 1981.
2. Понугаева А. Г. Импринтинг (Запечатление), Л., Наука, 1973.
3. Bateson P. P. G., Horn G., Rose S. P. R. Brain Res., v. 39, p. 445—465, 1972.
4. Рижинашвили Р. С., Мониава Э. С., Марсагишвили Г. А., Мосидзе В. М. Сообщ. АН ГССР, т. 105, с. 589—592, 1982.
5. Рижинашвили Р. С., Зурабишвили Э. А., Мосидзе В. М., Марсагишвили Г. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 92, с. 16—17, 1981.
6. Chapotier C. La Recherche, v. 8, p. 994—995, 1977.
7. Horn G., Rose S. P. R., Bateson P. P. G. Science, v. 181, p. 506—514, 1973.
8. Haywood J., Hambley J., Rose S. P. R. Brain Res., v. 92, p. 219—225, 1975.
9. Horn G., McGabe B. J., Bateson P. P. G. Brain Res., v. 168, p. 361—373, 1979.
10. Bredley P., Horn G., Bateson P. P. G. Experim. Brain Res., v. 41, p. 115—120, 1981.
11. Horn G. VIII Гагск не беседы (под ред. Оннани Т. И.), Тбилиси, Мещнереба, 1983.
12. Заалишвили Э. А., Рижинашвили Р. С., Марсагишвили Г. А. Сообщ. АН ГССР, т. 97, с. 181—184, 1980.
13. Собчинская Н. М., Рижинашвили Р. С., Марсагишвили Г. А. Сообщ. АН ГССР, т. 102, с. 461—463, 1981.
14. Коветиани П. А., Алексидзе Н. Г., Клейн Е. Э. Нейрохимические аспекты памяти (под ред. Кругликова Р. И.), Тбилиси, Мещнереба, 1980.
15. Коветиани П. А. VII Гагские беседы (под ред. Оннани Т. И.), с. 472—484, Тбилиси, Мещнереба, 1979.
16. Коветиани П. А. Нейрохимия, т. 1, с. 394—405, 1982.
17. Микадзе Д. Г. Циклические нуклеотиды, ионы кальция и протеинкиназные реакции в нервной ткани, Тбилиси, Мещнереба, 1983.
18. Клейн Е. Э., Чоговадзе Н. С. Изв. АН ГССР, сер. биол., т. 4, с. 509—515, 1978.
19. Клейн Е. Э. Сообщ. АН ГССР, т. 94, с. 701—704, 1979.
20. Клейн Е. Э., Чоговадзе Н. С. Вопросы биохимии нервной и мышечной систем, с. 204—217, Тбилиси, Мещнереба, 1979.
21. Ruddel A. A., Jacob-Lorena M. Anal. Biochem., v. 122, p. 244—252, 1982.
22. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман Н. Основы биохимии, М., Мир, т. 1, 1981.
23. Природа холинорецептора и структура его активного центра (под ред. Вепридзева). Пушкино, 1975.
24. Кругликов Р. И. Нейрохимические механизмы обучения памяти, М., Наука, 1981.

Поступила 7. IX 1984