НЕЙРОХИМИЯ

т. 6, № 2, 1987

УДК 577.612.015

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРА МУСКАРИНОВОГО ТИПА МОЗГА ПРИ ИМПРИНТИНГЕ У ЦЫПЛЯТ

СОЛОМОНИЯ Р. О., СОБЧИНСКАЯ Н. М., МИКЕЛАДЗЕ Д. Г.

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

Было изучено изменение количества холинорецептора мускаринового типа в интермедиатной части медиального вентрального гиперстриатума (ИМВГ) цыплят в процессе импринтинга (запечатлевания). Первичное световое раздражение как в экспериментальной, так и в контрольной группе вызывало сильное увеличение количества холинорецептора, которое частично уменьшалось через 30 мин. Наблюдали два четко различимых временных периода, характерных для импринтинга: 1) 30—60 мин после импринтинга с высокой активностью холинорецепторной системы; 2) 60—120 мин после импринтинга с низкой активностью холинорецепторной системы. ИМВГ правого полушария цыплят как экспериментальных, так и контрольных групп реагируют соответственно на импринтинг-объект и диффузный свет более сильно, чем левого. Предполагается, что этот феномен функциональной асимметрии не является существенным для записи следов импринтинга, а обусловлен генетически детерминированным ответом на первичное световое раздражение.

Многочисленные биохимические [1—5] и фармаколого-биохимические [6—9] исследования указывают на существенную роль этой системы в процессах формирования и хранения следов памяти. Дальнейшее успешное изучение этой проблемы во многом зависит от выбранной модели исследования. Одной из предпочитаемых моделей является импринтинг у цыплят. Импринтинг как модель для исследования памяти обладает существенным преимуществом по сравнению с другими моделями обучения, так как определен участок головного мозга цыплят, которому принадлежит ведущая роль в записи следов импринтинга. Он соответствует ИМВГ [10—12].

Изменению количества холинорецептора мускаринового типа в процессе импринтинга посвящено относительно мало работ, в которых в основном и исследуется только одна временная точка [3, 5].

Поэтому целью настоящего исследования являлось изучение изменения холинорецептора мускаринового типа в динамике в ИМВГ цыплят в процессе импринтинга.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на цыплятах породы белый леггорн. За день до вылупления яйца изолировали в отдельные коробки для устранения неспецифических побочных раздражений. Цыплят импринтировали в сенситивном периоде, через 17—20 ч после вылупления в аппарате Гесса [13]. Импринтинг-объектом служил красный полиэтиленовый цилиндр (с лампой 25 ВТ) диаметром 9,6 см, высотой 14 см. Световой прибор вращался на манеже по кругу радиусом 60 см. Экспозиция импринтинг-объекта продолжалась 15—20 мин (за это время цыпленок пробегал 15—20 м). Критерием импринтирования служила реакция следования за световым импринтинг-объектом. Контролем служили цыплята, которые за тот же период времени освещались диффузным светом. До и после импринтирования цыплят содержали в отдельных коробках, в темноте, изолированно от внешних раздражителей. После декапитации проводили экстирпацию ИМВГ и замораживали в жидком азоте.

Для определения количества холинорецептора мускаринового типа использовали мембранную фракцию ИМВГ после осмотического шока, полученного по методу Cotman и соавт. [14]. Количество холинорецептора мускаринового типа определяли по разнице между общим и неспецифическим связыванием с [^{3}H] куниклидилбензилатом (КНБ). Пробы в объеме 250 мкл содержали буфер трис-Кребс-Рингера (P_4) следующего состава: 145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,2 мМ $CaCl_2$, 1,3 мМ $MgCl_2$, 2 мМ NaH_2PO_4, 10 мМ глюкозы, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, [^{3}H] КНБ (16 K_u/мМ, „Amersham", Англия) в концентрации 10 нМ и 100 мкг мембранного белка (осадок P_1, полученный по методу Cotman и соавт. [14]). Для определения неспецифического связывания в пробы добавляли атропин-сульфат до концентрации 10 мкМ. Инкубацию проводили при 4° в течение 90 мин. Пробы фильтровали на фильтрах CF/C и просчитывали в толуольном сцинтилляторе на жидкостном сцинтилляционном спектрометре SL 4000 („Intertechnique", Франция). Белок определяли по методу Bradford [15].

При исследовании временной зависимости состояния холинорецепторов от импринтирования началом отсчета был момент предъявления цыплятам импринтинг-объекта (эксперимент) или начало освещения диффузным светом (контроль). Концом данного интервала времени считался момент декапитации. На каждой временной точке испытывалась группа цыплят, состоявшая из 12 экспериментальных и 12 контрольных животных (число параллельных измерений также равнялось 12). Результаты обрабатывали статистически, достоверность различий и уровень значимости определяли по критерию распределения Стьюдента для малых выборок.

Результаты и обсуждение

На рисунке представлены данные изменения количества холинорецептора мускаринового типа ИМВГ цыплят в процессе импринтинга.

Резкое увеличение (~ в 3 раза) количества холинорецептора наблюдали как у экспериментальных, так и у контрольных животных сразу после импринтинга и соответствующего освещения диффузным светом. Через 30 мин происходил обратный процесс, хотя количество холинорецептора не достигало начального уровня и в экспериментальной группе превосходило контрольный на 18—24% (рис., *а, б*). За последую-

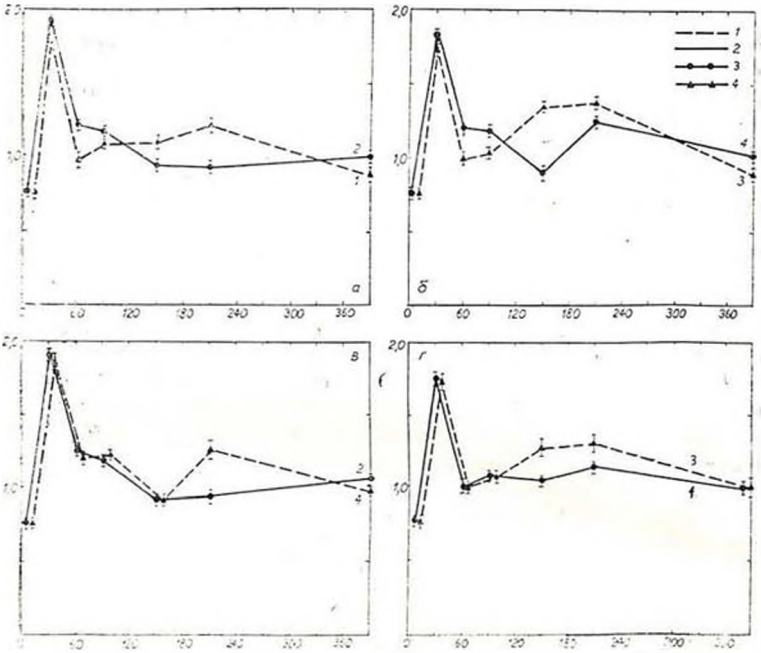

Рис. Изменение количества холинорецептора в интермедиатной части медиального вентрального гиперстриатума в зависимости от времени после начала импринтинга (*а, б, в*) и освещения диффузным светом (*г*). *1*—левое полушарие, контроль; *2*—левое полушарие, эксперимент; *3*—правое полушарие, контроль; *4*—правое полушарие, эксперимент. По оси абсцисс—время после начала импринтинга (мин); по оси ординат—содержание холинорецептора (пмоль [^{3}H]хинуклидинилбензилата/мг белка)

щие 30 мин разница между импринтированными и контрольными цыплятами в малой степени уменьшалась за счет некоторого повышения количества холинорецептора у последних (рис., *а, б*). Спустя 2 ч после окончания импринтинга ИМВГ полушарий экспериментальных цыплят не отличались друг от друга (рис., *в*), в то время как у контрольных цыплят проявлялась функциональная асимметрия (рис., *г*). ИМВГ правого полушария превосходила ИМВГ левого по исследуемому параметру на 26,5% (рис., *г*), и каждая из них была выше, чем в соот-

ветствующей экспериментальной группе (рис., *а, б*). За последующий час разница между контрольной и экспериментальной группами оставалась приблизительно такой же (рис., *а, б*), но уже начинала проявляться функциональная асимметрия в экспериментальной группе: ИМВГ правого полушария превосходила ИМВГ левого на 26.8% (рис., *в*). Спустя 6 ч после окончания импринтинга разницы по количеству холинорецептора между ИМВГ левого и правого полушарий в экспериментальной и контрольной группах, а также между этими группами практически не наблюдалось (рис., *в, г*).

При исследовании биохимических механизмов импринтинга необходимо принять во внимание тот факт, что перед освещением диффузным светом и перед предъявлением импринтинг-объекта контрольные и экспериментальные цыплята находились в темноте. У крыс, которых с рождения помещали в темные камеры, после их помещения на свет отмечался усиленный синаптогенез и связанный с этим процессом целый ряд биохимических изменений в зрительной коре головного мозга [16—18], составной частью которой, как уже отмечалось, является ИМВГ. В частности, в нашей предыдущей работе было установлено усиление синтеза синаптосомных гликопротеинов в процессе импринтинга [19].

Таким образом, независимо от обучения, как в экспериментальной, так и в контрольной группе отмечается усиленный синаптогенез, а этот процесс, как известно, является одним из основных механизмов памяти [20]. Однако следует отметить, что обнаруженная нами разница между контролем и экспериментом отражает процессы, характерные для памяти, а не изменения, свойственные для общего синаптогенеза.

Сложную флуктуацию количества холинорецептора в ИМВГ цыплят можно объяснить совпадением во времени двух взаимосвязанных процессов: синаптогенезом, индуцированным светом, и фиксацией следов памяти. Интересным является резкое увеличение количества холинорецептора в обеих группах цыплят после импринтинга и соответствующего освещения диффузным светом. Поскольку 15—20 мин (см. Материалы и методы) являются недостаточными для синтеза *de novo* и встраивания в мембраны большого количества функционального холинорецептора, можно предположить, что в этом случае имеет место сенситизация—«демаскирование» рецептора. Детальные биохимические механизмы, лежащие в основе «демаскирования», к настоящему времени описаны только для глутаматного рецептора [21]. Кроме того, через 30 мин наблюдалось резкое уменьшение количества холинорецептора, что также подтверждает наше предположение об отсутствии синтеза рецептора *de novo*, так как катаболическое расщепление быстрообновляемых белков является термодинамически невыгодным для биологической системы. Литературные данные позволяют предположить, что в уменьшении активности и чувствительности холинорецепторных белков участвуют системы посттрансляционной модификации, в частности фосфорилирования белков [22—24]. Интересно отметить, что на 30-й мин после окончания импринтинга оба полушария экспериментальной группы

по количеству холинорецептора превосходят соответствующие контроли. То же самое наблюдалось и в последующие 30 мин. Учитывая, что по холинорецепторной активности экспериментальная группа превосходила контрольную, можно заключить, что период времени 30—60 мин после импринтирования является критическим для этого вида памяти. Надо отметить, что увеличение количества холинорецептора через 30 мин после обучения наблюдалось также и в случае выработки пассивного избегания у цыплят [4]. Кроме того, поскольку последующий 1 ч характеризовался угнетением холинорецепторной активности в экспериментальной группе, не исключено, что и эта фаза является характерной для процесса консолидации следов импринтинга. Именно в этом промежутке времени отмечался усиленный синтез синаптических гликопротеинов [19].

Особого внимания заслуживает факт функциональной асимметрии у цыплят обеих групп. Более сильное и быстрое реагирование на импринтинг-объект правого полушария было отмечено в случае АХЭ и синтеза синаптосомных гликопротеинов [25, 19]. Однако аналогичное явление не отмечалось у контрольных цыплят при освещении диффузным светом. В случае холинорецептора мускаринового типа функциональная асимметрия наблюдалась также и у контрольных цыплят. Правое полушарие реагировало более сильно на световое раздражение, чем левое. Эти данные могут указывать на генетически детерминированную асимметрию зрительной коры головного мозга цыплят в процессе синаптогенеза.

Таким образом, полученные результаты по активности холинорецептора мускаринового типа указывают на два различных периода, характерных для процесса импринтинга: I период—30—60 мин после импринтирования с высокой активностью холинорецепторной системы, а II—60—120 мин после импринтирования с низкой активностью холинорецепторной системы. Второй период совпадает с фазой активного синтеза синаптических гликопротеинов [19] и должен представлять собой период фиксации следов памяти-импринтинга.

ALTERATION OF THE MUSCARINIC TYPE CHOLINORECEPTOR STATE IN THE CHICK BRAIN DURING IMPRINTING

SOLOMONIA R. O., SORCHINSKAYA N. M., MIKELADZE D. G.

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

Alteration of the muscarinic type cholinoreceptor amount was studied in the chick intermediate part of medial hyperstriatum ventrale (IMHV) during imprinting. Initial light exposure causes drastic increase in the amount of cholinoreceptor both in the experimental and control groups, which is partially abolished after 30 minutes. Two, well distinguished specific periods were observed during imprinting-memory;

1) 30—60 minutes after imprinting are characterised by high activity of cholinoreceptor system and 2) 60—120 minutes after imprinting—by low activity of cholinoreceptor system. IMHV of chick right hemisphere in experimental and control groups, response correspondingly to imprint-object and diffuse light more stronger, than IMHV of the left one. It is suggested that this fenomenon of functional asymmetry is not essential for the recording of imprinting memory traces, but is due to genetically determined response to initial light exposure.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Селиванова А. Т.* Высш. нервн. деят., т. 24, № 6, с. 1202—1210, 1974.
2. *Кругликов Р. И.* Нейрохимия механизмов обучения и памяти. М., Наука, 1981.
3. *Longstaff A., Rose S. P. R.* J. Neurochem., v. 37, № 5, p. 1089-1098, 1931.
4. *Rose S. P. R., Gibbs M. E., Hambley J.* Neuroscience, v. 5, № 1, p. 169—172, 1980.
5. *Bradley P., Horn G.* Exp. Brain. Res., v. 41, № 1, p. 121—123, 1981.
6. *Ильюченок Р. Ю.* Фармакология обучения и памяти. Новосибирск, Наука, 1972.
7. *Gardner R., Ray R., Grakenheim J., Wallace K., Robighaud R.* Pharm Biochem. and Behav., v. 21, № 1, p. 43—46, 1984.
8. *Lerer B., Altman H., Stanley M.* Pharm. Biochem. and Behav., v. 21, № 3, p. 467—469, 1984.
9. *Harotinian V., Kanof P., Davis K. L.* Life Sci., v. 37, № 10, p. 945—952, 1985.
10. *Horn G., McCabe B. J.* J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 275, № 1, p. 2—3, 1978.
11. *Kohsaka S., Takamatsu K., Aoki E., Tsukada Y.* Brain Res., v. 172, № 3 p. 539—544, 1979.
12. *McCabe B. J., Cipolla-Neto J., Horn G., Bateson P. P. G.* Exp. Brain. Res., v. 48, № 1, p. 13—21, 1982.
13. *Понугаева А. Р.* Импринтинг (запечатлевание). Л., 1973.
14. *Cotman C. W., Barber G., Chaurech J., Taylor A.* J. Cell. Biol., v. 63, № 3, p. 441—455, 1974
15. *Bradford M. M.* Anal. Biochem., v. 72, № 2, p. 248—254, 1976.
16. *Burgoune R. D., Rose S. P. R.* J. Neurochem., v. 34, № 3, p. 510—517, 1980.
17. *Fivkova E.* J. Neurobiol., v. 1, № 2, p. 285—294, 1970.
18. *Cragg B. G.* Exp. Neurol., v. 46, № 3, p. 445—451, 1975.
19. *Соломония Р. О., Микелаадзе Д. Г.* Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 393—397, 1986.
20. *Rose S. P. R.* Neuroscience, v. 6, № 4, p. 811—821, 1981.
21. *Lunch G., Baudry M.* Science, v. 224, № 4653, p. 1057—1063, 1984.
22. *Burgoune R. D.* FEBS Lett., v. 122, № 2, p. 288—292, 1980.
23. *Burgoune R. D.* FEBS Lett., v. 127, № 1, p. 144—147, 1981.
24. *Burgoune R. D.* J. Neurochem., v. 40, № 2, p. 324—331, 1983.
25. *Solomonia R. O., Sobchinskaya N. M., Zaalishvili E. A.* J. Neurochem., v. 44, suppl S70, 1985.

Поступила 15. X 1986