



УДК 577.152.277+612.82+612.821.3

ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ЛИЗОСОМ ГОЛОВНОГО
МОЗГА ДЛЯ КИСЛОЙ РНКазы ПРИ ОБУЧЕНИИ
КРЫС РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ

НЕЧАЕВА Г. А., ЛОПАТИНА Н. Г.

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Функциональная активность клеток головного мозга при обучении связана с изменением свойств их мембранных структур и внутриклеточным перемещением ряда высокомолекулярных соединений [1—3]. Одним из факторов, влияющих на состояние мембран, является действие основных белков—гистонов, которые увеличивают проницаемость клеточных мембран [4—6]. Гистоны головного мозга могут мигрировать из клеточных ядер [8, 9] и связываться с анионными группами эндоплазматического ретикулума [8]. Особенно ярко проявляется их действие на мембрану лизосом [6, 7, 10]. Гистоны слюнной железы телят в физиологической концентрации (0,5—50 мкг/мл) резко увеличивают проницаемость мембраны лизосом для лизосомных гидролаз, главным образом, для кислой РНКазы [6, 7]. Стимулирующий эффект гистонов на выход кислой РНКазы из лизосом головного мозга зависит от концентрации гистонов и уменьшается при исследовании лизосом животных, подвергающихся выработке условного рефлекса активного избегания (УРАИ) [11].

Целью настоящей работы было выяснить, наблюдается ли корреляция между степенью обученности крыс УРАИ и изменением проницаемости мембран лизосом головного мозга для кислой РНКазы. Для этого сопоставлены результаты, полученные при исследовании двух линий крыс, селекционированных из линии Крушинского-Молодкиной по высокому и низкому числу УРАИ. Проведено также сопоставление действия на выход кислой РНКазы из лизосом больших полушарий головного мозга крыс линии *Wistar* сочетанных (при обучении) и несочетанных (при псевдообучении) раздражителей, что позволило разграничить изменения, возникающие вследствие обучения от изменений, обусловленных воздействием стрессорных, сенсорных и двигательных влияний, сопровождающих выработку УРАИ.

В работе использованы крысы-самцы массой 160—170 г. Выработку УРАИ осуществляли в челночной камере двустороннего активного избегания. У крыс, селектированных из линии Крушинского-Молодкиной по высокой (линия ВЛ) и низкой (линия НЛ) способности к образованию УРАИ [12] выработку условного рефлекса проводили в течение 4 дней, во время 4 сеансов с промежутком в 24 ч. В каждом сеансе животные получали с интервалом в 30 с по 20 сочетаний условного раздражителя (свет) с безусловным (электрический ток силой 1,5 А). Всего животные получали 80 сочетаний условного раздражителя с безусловным. В каждом опыте обучали одновременно 2-х животных—одно линии ВЛ, другое—линии НЛ. Крыс линии *Wistar* обучали в течение одного дня. Животные получали все 80 сочетаний условного раздражителя с безусловным за один сеанс с теми же интервалами между раздражителями, что и при 4-дневном обучении. При этом исследовали одновременно 3-х животных: подвергнутое выработке условного рефлекса (массированное обучение); псевдообученное, которому предъявляли несочетанные условный и безусловный раздражители (активный контроль); интактное (пассивный контроль).

Через 30 мин после окончания обучения животных декапитировали в холодной комнате и все последующие операции проводили на холоду. Из больших полушарий головного мозга готовили гомогенаты (10%) в 0,32 М сахарозе с 0,001 М ЭДТА и 0,01 М трис-НСl буфером, рН 7,4, из которых получали обогащенные лизосомами фракции (ОЛФ) [6, 11]. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1100 g. Из надосадочной жидкости центрифугированием при 12000 g в течение 20 мин получали осадок ОЛФ и промывали его 0,32 М сахарозой с 0,01 М трис-НСl буфером, рН 7,4. В промытом осадке содержалось около 80% всей активности кислой РНКазы и кислой фосфатазы гомогенатов больших полушарий.

Для определения проницаемости мембраны лизосом для кислой РНКазы свежевыделенные осадки ОЛФ из больших полушарий головного мозга подопытных и контрольных крыс суспендировали в 0,25 М сахарозе с рН 7,4. Пробы (1 мг белка в 1 мл) инкубировали в водяном термостате при 25° в течение 30 мин в 0,25 М сахарозе с 0,01 М трис-НСl буфером, рН 7,4, с добавлением ядерного гистона тимуса H_{2a} и без добавления. Затем пробы охлаждали и центрифугированием при 12000 g в течение 20 мин отделяли осадок (ОЛФ). В надосадочной жидкости определяли активность кислой РНКазы, как описано ранее [6, 11], по величине которой судили о выходе фермента из лизосом. Активность РНКазы выражали в ΔA_{260} /мг белка. Величину выхода кислой РНКазы из лизосом рассчитывали также в % от суммарной активности латентной кислой РНКазы, взятой для инкубации суспензии ОЛФ. Латентную РНКазу в осадке ОЛФ определяли с добавлением 0,1%-ного тритона X-100 [6, 11]. Белок определяли методом Lowry и соавт. [13].

Результаты определения величины выхода кислой РНКазы из ли-

зосом, выделенных из больших полушарий головного мозга обученных, псевдообученных и интактных крыс линии *Wistar*, приведены в табл. 1. Из таблицы видно, что ОЛФ интактных крыс (пассивный контроль) устойчивы в 0,25 М сахарозе, рН 7,4: при их инкубации (25°, 30 мин) наблюдается лишь незначительный (около 6% от всей активности фермента в суспензии ОЛФ) спонтанный выход кислой РНКазы из лизосом. При добавлении в инкубируемую суспензию ОЛФ ядерных гистонов (H_{2a} 20 мкг/мл) проницаемость лизосомных мембран для кислой РНКазы повышалась примерно на 100%. Из таблицы видно также, что спонтанный выход кислой РНКазы из лизосом у крыс, подвергав-

Таблица 1

Влияние 1-дневного обучения (80 сочетаний, 10—15 условных рефлексов) и псевдообучения на выход кислой РНКазы (1— A_{260} мкг белка, 2—в % от общей активности кислой РНКазы ОЛФ) из лизосом больших полушарий головного мозга крыс линии *Wistar* при инкубации суспензии ОЛФ в 0,25 М сахарозе с добавлением 20 мкг/мл гистона H_{2a} и без него (n=8)

Состояние животных	Активность РНКазы	Спонтанный выход в 0,25 М сахарозе I	Выход в 0,25 М сахарозе с гистонам II	Стимулируемый гистонам выход II—I
Пассивный контроль	1	0,726±0,008	1,594±0,090	0,714±0,082
	2	6,49±0,14	13,30±0,01	6,91±0,65
Активный контроль (псевдообучение)	1	1,186±0,089 $p_1 < 0,01$	1,352±0,085 $p_1 < 0,05$	0,135±0,110 $p_1 < 0,01$
	2	10,15±0,76 $p_1 < 0,001$	12,53±0,75 $p_1 < 0,05$	1,11±1,02 $p_1 < 0,01$
Обучение	1	1,002±0,099 $p_2 > 0,05$	1,366±0,085 $p_2 > 0,05$	0,350±0,125 $p_2 > 0,05$
	2	9,28±0,72 $p_2 > 0,05$	12,07±0,72 $p_2 > 0,05$	3,48±1,91 $p_2 > 0,05$

Примечание. Приведена достоверность изменений при сопоставлении рядов: p_1 —активный контроль/пассивный контроль, p_2 —обучение/псевдообучение (активный контроль).

шихся массированному обучению и псевдообучению, был выше, чем у интактных животных, а стимулирующий эффект гистона у этих животных, по сравнению с интактными, уменьшался. При этом у обученных животных, по сравнению с псевдообученными, достоверных изменений спонтанного и стимулированного гистонами выхода не обнаружено. Результаты опытов с исследованием выхода кислой РНКазы из лизосом после 4-дневного обучения крыс линии ВЛ (80 сочетаний, 30—40 УР) и линии НЛ (80 сочетаний, 1—10 УР) представлены в табл. 2. Из этих данных видно, что величина спонтанного выхода кислой РНКазы из лизосом у крыс НЛ была выше, чем у крыс ВЛ, и примерно такой же, как у псевдообученных крыс линии *Wistar*. В то же время выход кислой РНКазы из лизосом в присутствии гистона у крыс с высокой способностью к образованию УРАИ (ВЛ) был меньше, чем у крыс с низкой способностью к образованию УР (НЛ) (табл. 2, II).

Таблица 2

Влияние 4-дневного обучения (80 сочетаний) на выход кислой РНКазы из лизосом больших полушарий головного мозга крыс 2-х линий с высокой (линия ВЛ) и низкой (линия НЛ) способностью к выработке УРАИ при инкубации суспензии ОЛФ в 0,25 М сахарозе с добавлением гистона (H_{22} 20 мкг/мл) и без него. Активность РНКазы: 1— A_{260} /мг белка, 2—в % от активности РНКазы в ОЛФ ($n=5$)

Линия крыс	Активность РНКазы	Спонтанный выход в 0,25 М сахарозе I	Выход с гистонами II	Стимулируемый гистонами выход II—I
Крысы ВЛ	1	$0,861 \pm 0,028$	$1,306 \pm 0,012$	$0,445 \pm 0,019$
80 сочетаний, 30—40 условных рефлексов	2	$6,93 \pm 0,15$	$10,52 \pm 0,31$	$3,41 \pm 0,38$
Крысы НЛ	1	$1,131 \pm 0,052$ $p < 0,01$	$1,690 \pm 0,025$ $p < 0,01$	$0,561 \pm 0,115$ $p > 0,05$
80 сочетаний, 1—10 условных рефлексов	2	$9,51 \pm 0,15$ $p < 0,01$	$14,24 \pm 0,14$ $p < 0,01$	$4,74 \pm 0,11$ $p > 0,05$

При выработке условного рефлекса активного избегания в течение 4 дней, как и при массированном 1-дневном обучении, животные получали одинаковое число (80) сочетаний условного раздражителя с безусловным. При этом выявлялась различная способность к выработке условного рефлекса у крыс линий ВЛ и НЛ. Число условных рефлексов за весь период обучения у крыс линии ВЛ достигало 30—40, а у крыс линии НЛ только 1—10. Во время массированного обучения у крыс линии *Wistar* наблюдалось от 10 до 15 условных реакций. После массированного обучения и псевдообучения, а также 4-дневного обучения крыс линии НЛ отмечалось увеличение спонтанного выхода кислой РНКазы из лизосом больших полушарий при инкубации суспензии ОЛФ в 0,25 М сахарозе, которое не зависело от степени обученности крыс и было обусловлено, вероятно, воздействием стрессорных факторов, сопровождающих выработку УРАИ. Такое предположение подтверждается результатами, полученными нами при исследовании проницаемости мембраны лизосом коры головного мозга после частичного и полного лишения крыс сна. Под влиянием 6 и 48 ч лишения крыс парадоксальной фазы сна и после полного лишения сна имело место увеличение спонтанного, а также достоверное уменьшение стимулируемого гистонами H_{22} выхода кислой РНКазы по сравнению с контрольным уровнем выхода этого фермента из лизосом [14].

При рассмотрении данных, полученных при изучении влияния гистона на проницаемость мембраны лизосом обращает внимание то обстоятельство, что у животных линии ВЛ наблюдается некоторое уменьшение, по сравнению с крысами линии НЛ, чувствительности мембраны лизосом к действию гистона (табл. 2. II) и снижение стимулирующего эффекта гистона.

В заключение необходимо отметить, что ситуация псевдообусловливания, несмотря на все отличие от ситуации выработки условного реф-

лекса, в той или иной мере может включать элементы выработки условной связи [1]. Эту возможность нельзя исключить. С другой стороны, исследование анионных групп липидов и фосфатных групп белков, с которыми могут взаимодействовать гистоны, могло бы представить количественную оценку изменения состояния мембраны лизосом при обучении и псевдообучении. Известно, что обучение может сопровождаться увеличением фосфорилирования белков ионных каналов [15], что приводит к изменению проницаемости мембраны.

PERMEABILITY OF BRAIN LYSOSOMAL MEMBRANES FOR ACID RNAse IN RATS OF DIFFERENT LINES UNDER TRAINING AND PSEUDOTRAINING

NECHAEWA G. A., LOPATINA N. G.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Acad. of Sci., Leningrad

Massive one-day training of animals (80 matchings 5--10 conditional reflexes of active avoidance) and pseudotraining lead to 1.5--2 fold increase in a spontaneous release of acid RNAse from big cerebral hemispheres' lysosomes, whereas histone H_{2u} -stimulated release of this enzyme from lysosomes decreases. After 4-day long elaboration of conditioned reflex (80 matchings) in rats with low ability to training the spontaneous release of acid RNAse from lysosomes was higher for 30% than in animals with high ability to training. Data obtained indicate that both functional load in training and unmatched irritations in pseudotraining induce changes in lysosomal membrane that lead to an increase in spontaneous release of acid RNAse in vitro conditions but are not coupled with the process of training per se.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крузиков Р. И. Нейрохимические механизмы обучения и памяти, М., Наука, 1981.
2. Matthies H., Pohle W., Popov N., Lössner B., Ruthrich H. L., Jork R., Ott T.—In: Neural and neurohumoral organization of motivated behavior (ed. K. Lisak), p. 85—105. Вр: Akad. Kiado, 1978.
3. Mark R.—In: Brain mechanisms in memory and learning: From the single neuron to man (ed. M. A. B. Brazier), p. 217—225, N.-Y. Raven Press, 1979.
4. Ryser H. J. P. Proc. of the Fourth intern. Congress in Pharmacology, v. 8, p. 95, Basel, 1970.
5. Boses R., Mendez F., Mendez L., Anigsten R. Exp. Cell Res., v. 76, p. 441, 1973.
6. Нечасва Г. А., Демин Н. Н., Ашмарин И. П. Докл. АН СССР, т. 202, № 1, с. 232—234, 1972.
7. Ашмарин И. П., Гойло Т. А., Гончарова В. П., Нечасва Г. А., Степанова Н. С. Биохимия, т. 40, в. 2, с. 331—337, 1975.
8. McIlwain H. Chemical exploration of the brain, N.-Y., 1963.

9. Браун А. Д. Тез. докл. научн. конф. Институт цитологии АН СССР, с. 16, Л., 1972.
10. Демин Н. Н., Нечаева Г. А. Вопросы биохимии мозга, т. 9, с. 171—176, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1974.
11. Ашмарин И. П., Демин Н. Н., Лопатина Н. Г., Нечаева Г. А. Физиол. журн. СССР, т. 38, № 4, с. 489—494, 1977.
12. Рыжова А. Ю., Кулакин Д. А., Лопатина Н. Г. Генетика, т. 19, с. 121—125, 1983.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275.
14. Демин Н. Н., Нечаева Г. А. VII Всесоюзн. нейрохимическая конф., тезисы научн. сообщений, с. 100—101, Л., 1976.
15. Neary J. T., Acosta-Urquidí J., Alkon D. L. J. Neurochem, v. 44, suppl. s. 13, 1985.

Поступила 17.XII 1986

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» ПРЕДЛАГАЕТ:

Иммунологические методы исследования (под ред. И. Лефковитса, Б. Перниса), перевод с англ., 1988, 38 л.

Книга представляет собой перевод III тома серии «Иммунологические методы». Переводы двух первых томов выпущены издательством «Мир» в 1981 и 1983 гг. В данный том вошли последние, наиболее актуальные методические разработки в области молекулярной и клеточной иммунологии.

Для иммунологов, специалистов по молекулярной биологии, цитологов, врачей, лаборантов научно-исследовательских институтов, аспирантов и студентов биологических специальностей.

Иммобилизованные клетки и ферменты (под ред. Дж. Вудворда), перевод с англ., 1988, 14 л.

Книга международного коллектива авторов (главным образом английских) представляет собой сборник современных методов, рекомендуемых для получения стабилизированных препаратов клеток и ферментов и их использования в практических целях. Подробно описаны приемы адсорбционной и ковалентной иммобилизации ферментов, иммобилизация включением в гель, комплексообразованием с металлами, микрокапсулированием, а также применение стабилизированных биологических препаратов для создания электродов и датчиков, проведения электрохимических процессов, модификации стероидов, анализа гормонов и других целей.

Для специалистов в области биотехнологии, биохимиков, химиков.