



УДК 577.612.015

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА КАТЕХОЛАМИНОВ В МОЗГУ ЦЫПЛЯТ В ПРОЦЕССЕ ИМПРИНТИНГА

СОЛОМОНΙΑ Р. О., МАЧАИДЗЕ Г. Г., СОБЧИНСКАЯ Н. М.,
МИКЕЛАДЗЕ Д. Г.

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

Методом хроматографии высокого давления с последующей электрохимической детекцией было изучено изменение уровней норадреналина (НА) и дофамина (ДА) в интермедиальной части медиального вентрального гиперстриатума (ИМВГ) цыплят в процессе импринтинга и освещения диффузным светом в течение первых 3,5 ч после начала эксперимента. Показано, что в обоих полушариях после первоначального уменьшения уровня ДА происходит его повышение, отличающееся у обученных и контрольных цыплят лишь определенным сдвигом во времени. Наблюдаемая функциональная асимметрия является эффектом первичного светового раздражения.

В отличие от ДА количество НА уменьшается во времени в течение всего эксперимента. Исключением является ИМВГ левого полушария обученных цыплят, где через 1 ч после импринтинга наблюдается повышение уровня НА. В остальных случаях изменение количества НА в экспериментальных и контрольных группах отличается по определенным сдвигам во времени. Предполагается, что отличающаяся динамика изменения количества НА в ИМВГ левого полушария экспериментальных цыплят является специфической для характеристики импринтинга.

Экспериментальный зрительный импринтинг у цыплят сопряжен с резким изменением целого ряда биохимических процессов, которые опосредованы, с одной стороны, записью энграммы памяти, а с другой — первичным световым раздражением [1, 2]. Консолидация следов памяти — импринтинга происходит в ИМВГ цыплят [3—5], в котором фиксируются биохимические изменения, индуцируемые первичным световым раздражением [1, 2].

Kety [6] и Crow, Arbutnot [7] первыми предположили о важном значении НА в процессах памяти и обучения. Особая роль принадлежит также НА в поддержании нормальной синаптической пластичности визуального кортекса цыплят [8]. Из четырех биогенных аминов с нейротрансмиттерными свойствами — НА, ДА, 5-гидрокситриптамин и гистамин, первые три присутствуют в ИМВГ цыплят [9]. Используя катехол-О-метилтрансферазный радиохимический метод [10, 11], Davies и соавт. [12] не обнаружили изменений в содержании НА и ДА в процессе импринтинга, хотя теми же авторами впоследствии с помощью нейротокси-а

DSP-4 была показана исключительная специфическая и важная роль НА для импринтинга [13]. В настоящей работе этот вопрос был пересмотрен с помощью метода ВЭЖХ с электрохимической детекцией катехоламинов.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на цыплятах породы белый леггорн. За день до вылупления яйца изолировали в отдельные коробки для устранения в сенситивном периоде через 20 ч после вылупления в аппарате Hess [4]. Импринт-объектом служил красный полиэтиленовый цилиндр, диаметром 9,6 см, высотой 14 см. Световой прибор вращался на манеже по кругу радиусом 60 см. Экспозиция импринт-объекта продолжалась 20—25 мин (за это время цыпленок пробегал ~20 м). Критерием импринтирования служила реакция следования за световым импринт-объектом. Контролем служили цыплята, которых за тот же период времени освещали диффузным светом. До и после импринтирования цыплят содержали в отдельных коробках, в темноте, изолированных от внешних раздражителей. После декапитации головной мозг цыплят помещали на алюминиевую пластину, охлажденную до температуры жидкого азота. Быструю экстирпацию медиальной части переднего мозга, состоящего в основном из ИМВГ, проводили согласно Davies и соавт. [12]. Фракции хранили в жидком азоте.

Объединенные образцы ИМВГ одной временной точки (14 образцов ~200 мг) гомогенизировали в 5 объемах буфера, содержащего 0,2 М HClO_4 , 0,15%-ный $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ и 0,05%-ный Na_2 -ЭДТА. В каждую пробу предварительно добавляли 20 мкл 10^{-6} М дигидроксibenзиламина (ДГБА) в качестве внутреннего стандарта. После центрифугирования pH супернатанта доводили до 8,8 с помощью 2 М трис и добавляли 10 мг активированного Al_2O_3 («Waters», США). Смесь встряхивали при 37° в течение 15 мин и центрифугировали. Осадок промывали 3 раза 0,2%-ным трис/ЭДТА, pH 8,1. Связанные соединения экстрагировались 100 мкл буфера: 0,4 М HClO_4 , 0,02% ЭДТА, 0,05% NaHSO_3 . Разделение катехоламинов и ДГБА проводили на жидкостном хроматографе высокого давления («Waters», США) на колонке с обращенной фазой Zorbax ODS с размерами частиц 5 мкм согласно методике Wagner и соавт [15]. Идентификацию соединений осуществляли с помощью электрохимического детектора ESA, Coulchem 5100 A (США), с углеродно-стеклянного электрода. Потенциал электрода составлял +0,7 В против Ag-AgCl электрода сравнения. Колонку уравнивали и элюцию проводили в буфере: 0,2М NaH_2PO_4 /метанол (соотношение 89:11 объем/объем), $2,5 \times 10^{-3}$ М н-гептансульфониловой кислоты и 10^{-4} М ЭДТА, pH 2,70 (pH доводили ортофосфорной кислотой). Скорость элюции равнялась 1 мл/мин. Объем введенного образца составлял 20 мкл. Было проведено 5 параллельных измерений для каждой пробы. Типичная картина разделения катехоламинов и ДГБА представлена на рис. 1.

Использование данной системы при дальнейшем хроматографировании осуществляет также четкое разделение кислых метаболитов ДА: 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты, 3-метокситирамина и гомованилиновой кислоты. Исходя из поставленной задачи хроматографию проводили только до 8-й мин (рис. 1). Автоматическую обработку хроматографических данных производили на интеграторе Chromatorac CR-2AX («Shimadzu», Япония). Количественную оценку катехоламинов прово-

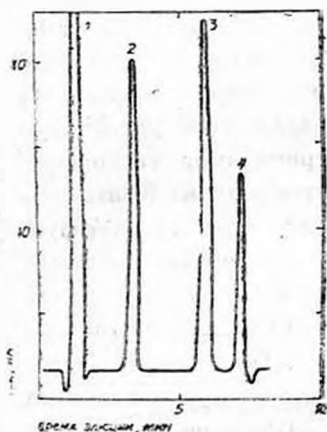


Рис. 1. Картина разделения катехоламинов и ДГБА с помощью хроматографии высокого давления с последующей электрохимической детекцией: 1—фронт растворителя, 2—2,05 мкг НА, 3—2,20 мкг ДГБА, 4—1,89 мкг ДА

дили согласно Ларскому и соавт. [16] следующим образом: рассчитывали отношение высоты пиков (альтернативно также площади пиков) катехоламинов мозга (относительно к внутреннему стандарту ДГБА) к высоте пиков или к площади пиков (также относительно к внутреннему стандарту) катехоламинов с известной концентрацией.

Пример расчета для НА:

$$\text{концентрация НА ИМВГ} = \frac{\text{НА/ДГБА ИМВГ}}{\text{НА/ДГБА стандартного раствора}} \times \text{НА}$$

Введение в формулу как высоты пиков, так и его площади давали практически одинаковые величины. Для статистической обработки использовали результаты, полученные обоими методами вычисления.

При исследовании временной зависимости уровня катехоламинов от импринтирования и освещения началом отсчета был момент предъявления цыплятам импринт-объекта (эксперимент) или начало освещения диффузным светом (контроль). Концом данного интервала времени считался момент декапитации. На каждой временной точке испытывали группу цыплят, состоявшую из 14 экспериментальных и 14 контрольных животных. Результаты обрабатывали статистически, достоверность различия и уровень значимости определяли по критерию распределения Стьюдента для малых выборок. Во всех специально не отмеченных случаях $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Данные об изменении уровня НА в процессе импринтинга и освещения диффузным светом представлены на рис. 2, а—г. Обучение сопро-

воздавалось одновременным уменьшением количества НА, которое сильнее выражено в правом ИМВГ (рис. 2, б, в: $\sim 33\%$), чем в левом ИМВГ (рис. 2, а, в; 16% , $p < 0,02$). У контрольных цыплят вышеописанные изменения не наблюдались (рис. 2, г). Через 30 мин у импринтированных цыплят уровень НА не менялся, но в контрольной группе происходило его снижение (рис. 2, г), причем в правом ИМВГ этот процесс был выра-

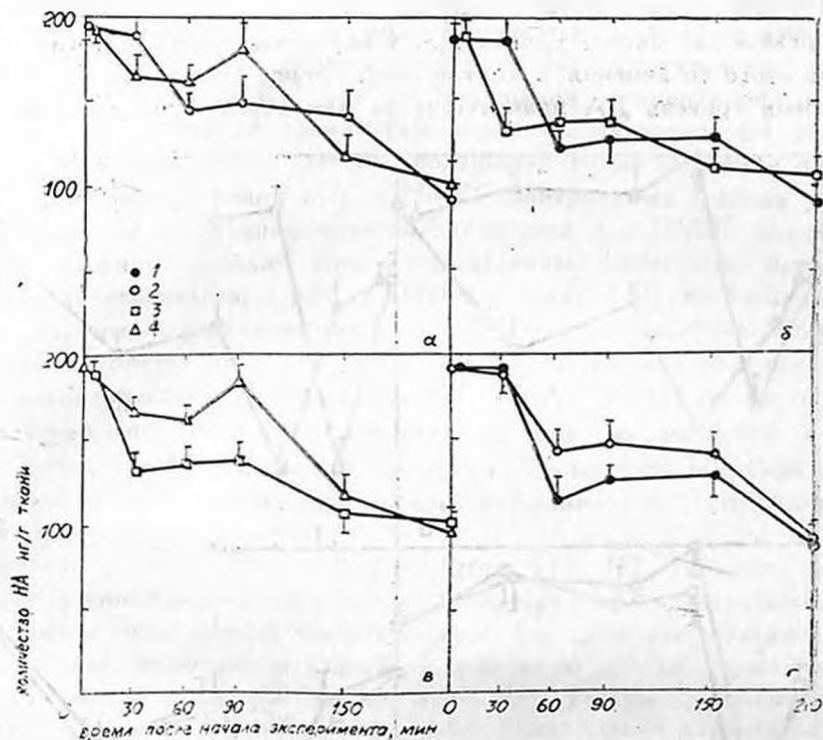


Рис. 2, а-г. Изменения количества НА и ИМВГ цыплят в зависимости от времени после начала эксперимента. Здесь и на рис. 3: 1—правое полушарие, контроль, 2—левое полушарие, контроль, 3—левое полушарие, эксперимент, 4—правое полушарие, эксперимент

жен сильнее (соответственно 45 и 27%). Интересным, на наш взгляд, являются изменения, происходящие через 90 мин после начала эксперимента. Уровни содержания НА в контрольных образцах и в образцах ИМВГ правого полушария обученных цыплят не отличались от своих предыдущих значений, а также друг от друга, но в то же время происходило некоторое повышение концентрации НА в ИМВГ левого полушария (по сравнению с предыдущим уровнем на 12,5%, $p < 0,01$), которое статистически достоверно превосходило этот показатель ($p < 0,001$) в остальных полушариях (рис. 2, а—г). Спустя 150 мин после начала эксперимента наблюдалось дальнейшее уменьшение уровня НА только у импринтированных цыплят. Через 3 ч после окончания обучения и освещения диффуз-

ным светом количество НА во всех четырех образцах было практически одинаково и составляло приблизительно половину от первоначального уровня.

Результаты изменений уровня ДА представлены на рис. 3. а—г. В отличие от НА они носят менее выраженный характер. Сразу же после окончания импринтинга количество ДА уменьшалось у экспериментальных животных, и в правом ИМВГ этот процесс был выражен более наглядно ($\sim 42\%$), чем в левом ($\sim 28\%$), рис. 3, а—в. Через 30 мин происходило резкое увеличение уровня ДА у обученных цыплят, тогда как количество этого соединения в контрольной группе снижалось. За последующее время уровень ДА практически не изменялся в экспериментальной

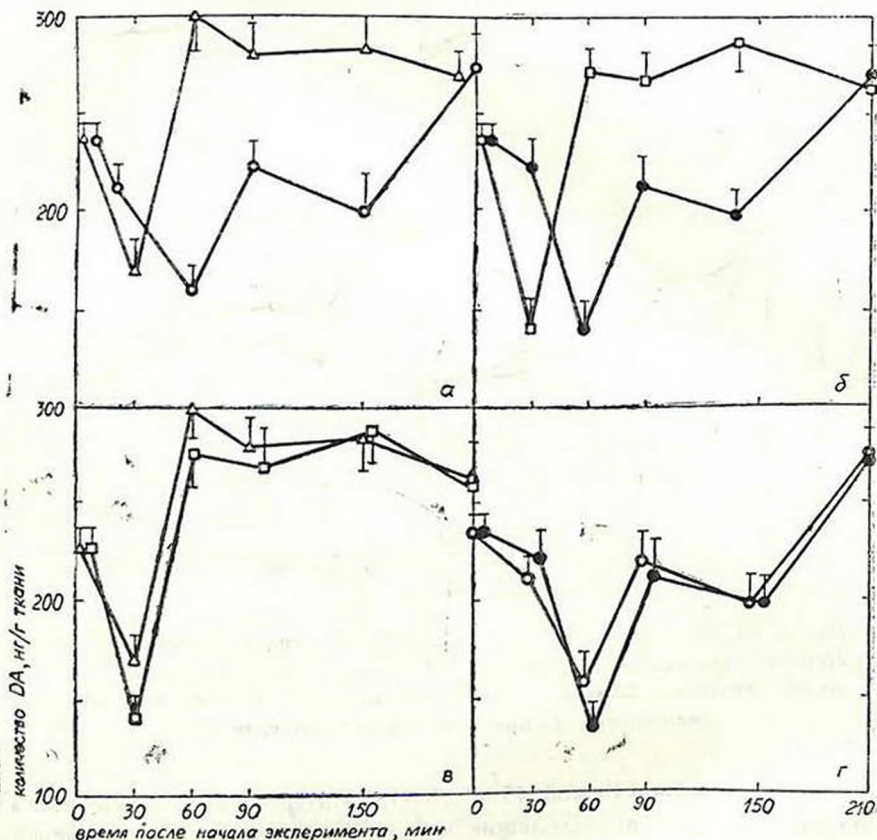


Рис. 3. а—г. Изменения количества ДА и ИМВГ цыплят в зависимости от времени после начала эксперимента. Обозначения те же, что и на рис. 2

группе, а у животных, освещенных диффузным светом, происходило постепенное его увеличение, так что через 210 мин после начала эксперимента уровень ДА в импринтированных и контрольных группах был практически одинаков и превосходил первоначальный на 20% (рис. 3, а—г).

Как видно из представленных данных, содержание катехоламинов претерпевало значительные изменения как в экспериментальных, так и в

контрольных группах цыплят. При этом характер изменений для НА и ДА различен. Общей тенденцией в случае НА является уменьшение его количества, тогда как для ДА после его первоначального уменьшения наблюдается увеличение содержания. В течение часа (временной интервал 60—120 мин после начала эксперимента) уровень НА в ИМВГ правого полушария экспериментальных цыплят остается постоянным. В отличие от него в ИМВГ левого полушария этот показатель остается постоянным только в течение 30 мин, а далее возрастает до первоначального уровня. За последующий период наблюдается постоянное уменьшение количества НА в ИМВГ обоих полушарий экспериментальных цыплят. Таким образом, для ИМВГ правого полушария импринтированных животных кривая изменений уровня НА имеет односторонний характер, в то время как для ИМВГ левого полушария четко выражена двухфазность. Флуктуация уровня НА в ИМВГ контрольных цыплят имеет в общем такую же тенденцию, которая характерна для ИМВГ правого полушария обученных цыплят, хотя с определенным сдвигом во времени.

Как уже отмечалось, в работе Davies и соавт. [12] не было найдено никаких изменений в количествах НА и ДА при импринтинге. Этот факт, по-видимому, можно объяснить тем, что используемый этими исследователями метод определения количества НА и ДА [10, 11] обладает малой разрешающей способностью и чувствительностью по сравнению с методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Кроме того, в данной работе исследовали динамику изменений уровней катехоламинов с большими временными интервалами (5—6 ч).

Согласно работам Kasamatsu, Petigrew [17, 18], снижение уровня НА ведет к уничтожению нейрональной пластичности в визуальном кортексе. Однако впоследствии было показано, что даже при резком снижении уровня НА включаются защитные механизмы для поддержания пластичности нейронов, компенсирующие до 90% утраты количества НА [19, 20]. Было показано также, что деструкция только адренергической системы не является достаточной для снижения пластичности в визуальном кортексе [9]. Таким образом, можно предположить, что уменьшение уровня НА в импринтированных и в освещенных диффузным светом цыплятах не означает уменьшения пластичности в ИМВГ цыплят.

Потери некоторых нейрональных элементов являются характерным феноменом во время постнатального онтогенеза мозга, и этот процесс особенно сильно выражен в визуальном кортексе [21—23]. Согласно гипотезе Bateson [24], процесс импринтинга можно воспринимать как конкретизацию запечатлеваний на определенный импринтинг-объект среди потенциально возможных, многочисленных объектов, что также связывают с потерей некоторых нейрональных структур и усилением других. Исходя из этого, общую тенденцию уменьшения уровня НА в экспериментальных и контрольных группах цыплят можно объяснить потерей определенных норадренергических структур, сопряженных с непрерывным выделением этого трансммиттера в оставшихся адренергических образованиях. Известно, что в ИМВГ левого полушария экспериментальных цыплят происходит

консолидация следов памяти—импринтинга. В то время как ИМВГ правого полушария играет роль «временного буфера» хранения информации [9]. Именно картина изменения уровня НА ИМВГ левого полушария обученных цыплят отличается от ИМВГ правого полушария и от ИМВГ контрольных животных. Отличительная черта динамики изменений количества НА в ИМВГ левого полушария экспериментальных цыплят, по-видимому, является характерной для записи следов памяти—импринтинга.

В отличие от НА изменения уровня ДА в импринтированных и в освещенных диффузным светом цыплятах отличаются друг от друга определенным сдвигом во времени. В обеих группах цыплят наблюдается общее увеличение уровня ДА, указывающее на повышение функциональной активности дофаминергических образований. Этот факт находится в согласии с нашими данными об общем усилении синтеза синапсомных гликопротеинов в процессе импринтинга и освещения диффузным светом [1].

Как для НА, так и для ДА в обеих группах цыплят наблюдается более сильное реагирование ИМВГ правого полушария. Этот феномен наблюдается также для холинорецептора мускаринового типа и обусловлен, по-видимому, генетически детерминированным ответом на первичное световое раздражение [2].

Для дальнейшего изучения роли катехоламинергической системы в процессе импринтинга необходимо исследование чувствительности нейро-рецепторов НА и ДА.

CHANGED LEVELS OF CATECHOLAMINES IN THE LEFT AND RIGHT CEREBRAL HEMISPHERE OF CHICKEN DURING IMPRINTING

SOLOMONIA R. O., MACHAIDZE G. G., SOBCHINSKAYA N. M., MIKELADZE D. G.

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

We used HPLC with subsequent electrochemical detection to study levels of noradrenaline (NA) and dopamine (DA) in the intermediate part of medial ventral hyperstriatum (IMHV) of chicken during either imprinting or exposure to diffuse lighting lasting for the first 3.5 hours after the beginning of the experiment. The initial fall in DA level in both hemispheres was followed by an increase, which differed in imprinted vs. control chickens only by a certain shift in time. The observed functional asymmetry is due to primary light stimulation.

In contrast to DA, the amount of NA decreases with time throughout the experiment. The exception was found for the IMHV of the left hemisphere of the imprinted chickens where the level of NA increased 1 hour after the imprinting. In other cases changes of the NA level in experimental and control groups differed only in temporal cha-

racteristics. It is proposed that the characteristic time response of the NA level in IMHV of the left hemisphere of experimental chicken is specifically associated with imprinting.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соломония Р. О., Микеладзе Д. Г. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 293—297, 1986.
2. Соломония Р. О., Собчинская Н. М., Микеладзе Д. Г. Нейрохимия, т. 6, № 2, с. 180—185, 1987.
3. Horn G., McCabe B. J. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 275, № 1, p. 2—3, 1978.
4. Kohsaka S., Takamatsu K., Aoki E., Tsukada Y. Brain Res., v. 172, № 3, p. 539—544, 1979.
5. McCabe B. J., Cipolla-Neto J., Horn G., Bateson P. P. G. Exp. Brain Res., v. 48, № 1, p. 13—21, 1982.
6. Kety S. S. „The biogenic amines in the central nervous system; Their possible roles in arousal, emotion and learning“ The Neuroscience; Second Study Program (ed. Schmidt F. O.), New-York. Rockefeller University Press, 1970.
7. Crow T. J., Arbuthnott G. W. Nature (New Biology), v. 238, p. 245—246, 1972.
8. Bear M. F., Singer W. Nature, v. 320, p. 172—176, 1986.
9. Horn G. Memory, imprinting and the brain, Oxford Psychology Series, № 10 (eds. D. E. Broadbent., J. L. McGaugh, J. N. Mackintosh, M. J. Posner, E. Tulving, L. Weiskrantz), Clarendon Press, Oxford 1985.
10. Coyle J. T., Henry D. J. Neurochem., v. 21, № 1, p. 61—67, 1973.
11. Cuello A. C., Hiley R., Iversen L. L. J. Neurochem., v. 21, № 5, p. 1337—1341, 1973.
12. Davies D. C., Horn G., McCabe B. J. Developm. Brain Res., v. 10, № 1, p. 251—255, 1983.
13. Davies D. C., Horn G., McCabe B. J. Behavioral Neuroscience, v. 99, № 4, p. 652—660, 1985.
14. Hess E. H. Science, v. 130, p. 133—141, 1959.
15. Wagner J., Vitali P., Palfreyman M. G., Zratka M., Hunt S. J. Neurochem., v. 38, № 6, p. 1241—1254, 1982.
16. Ларский Э. Г., Бархатова В. П., Демина Е. Г. Лаб. дело, т. 9, с. 519—522, 1985.
17. Kasamatsu T., Pettigrew J. D. Science, v. 194, p. 206—209, 1979.
18. Kasamatsu T., Pettigrew J. D. J. Comp. Neurol., v. 185, № 1, p. 139—162, 1979.
19. Bear F. M., Paradiso A. M., Schwartz M., Nelson S. B., Carnes K. M., Daniels J. D. Nature v. 302, p. 245—247, 1983.
20. Daw N. W., Videen T. O., Parkinson D., Rader R. K. J. Neurosci., v. 5, p. 1925—1933, 1985.
21. Boothe R. G., Greenough W. T., Lund J. S., Wrege K. J. Comp. Neurol., v. 186, p. 473—490, 1979.
22. Dardennes R., Jarreau P. H., Meininger V. Dev. Brain Res., v. 16, № 1, p. 159—164, 1984.
23. Cragg B. G. Exp. Neurol., v. 46, p. 445—451, 1975.
24. Bateson P. P. G. Animal. Behav., v. 27, p. 470—485, 1979.

Поступила 14. VI 1988