

И. С. ПЕРСИНА, Ю. Я. ГЕЙНИСМАН

СДВИГИ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В НЕЙРОНАХ ПРИ ТОРМОЖЕНИИ ИХ АКТИВНОСТИ

(Представлено академиком М. Н. Ливановым 29 XI 1971)

В настоящее время установлено, что метаболизм белков в нервных клетках изменяется при деятельном их состоянии (¹⁻³). Однако цитохимические проявления тормозных процессов остаются неизученными. Поэтому в данной работе была предпринята попытка выявить возможные сдвиги содержания белка в нейронах при торможении их активности.

Содержание белков в нервных клетках определяли с помощью метода цитоинтерферометрии. Для этого ткань мозга, взятую тотчас после умерщвления животных, фиксировали в жидкости Карнуа и заливали в парафин, соблюдая условия одновременной гистологической обработки контрольного и опытного материала. Серийные поперечные срезы головного и спинного мозга готовили при установке микротомы на 5 μ , и реальную толщину срезов определяли в двойном микроскопе МИС-11. Концентрацию плотных веществ, которые в фиксированной нервной клетке представлены преимущественно белками (¹), измеряли в интерференционном микроскопе МБИН-4 с шириной раздвоения 165 μ при монохроматическом свете с длиной волны 0,56 μ , пользуясь ширинг-объективом 40 $\times$, окуляром 15 $\times$ и поворотным анализатором Сенармона. Из показаний анализатора вычисляли концентрацию плотных веществ по общепринятой формуле (¹). Содержание плотных веществ в ядре и цитоплазме нейронов определяли как произведение их концентрации на объем клеточной структуры. Для нахождения объемов винтовым окуляр-микрометром МОВ-1-15 $\times$ измеряли наибольший и перпендикулярный ему наименьший диаметры клеточного тела и ядра. Объем рассчитывали по соответствующим формулам, выведенным методом оптической реконструкции или путем измерения осей клеток на продольных и поперечных срезах мозга (⁴). Достоверность различий между контролем и опытом оценивали статистически, пользуясь критерием хи-квадрат для сравнения двух эмпирических распределений.

В первой серии экспериментов вызывали торможение активности нейронов ядра Дейтерса в результате бинауральной поляризации лабиринтов. Как показали электрофизиологические исследования (^{5, 6}), при поляризации одного лабиринта катодом активность большинства нейронов в контралатеральном ядре Дейтерса подавляется. Важно отметить, что такое контралатеральное торможение обусловлено генерацией тормозных постсинаптических потенциалов (^{6, 7}). При одновременной поляризации лабиринтов разнополюсными электродами тормозящее действие контралатерального катода усиливается ипсилатеральным анодом (⁶), и в ядре Дейтерса на стороне приложения анода преобладающей реакцией является подавление активности нейронов.

Опыты проводили на половозрелых самцах крыс линии Вистар. Под легким эфирным наркозом перфорировали барабанные перепонки, и к костному краю круглого окна подводили электроды, на которые подавали ток силой 0,3 ма. Правый электрод служил анодом, а левый — катодом. Поляризация длилась 2, 10 или 30 мин. Сразу по ее окончании подопыт-

ных животных забивали обезглавливанием, по 5 крыс на каждый срок поляризации. Одновременно обезглавливали контрольных животных (всего 5 крыс), которые отличались от подопытных лишь тем, что их не подвергали воздействию поляризующего тока. Цитохимически обследовали крупные нейроны в правом ядре Дейтерса у подопытных крыс или в обоих ядрах Дейтерса у контрольных крыс, так как у последних различий между нейронами этих парных ядер выявлено не было.

Результаты цитохимического анализа приведены в табл. 1. Выяснилось, что торможение активности нейронов Дейтерса сопровождается существенным уменьшением содержания белков в их ядре и цитоплазме.

Таблица 1

Содержание белков в пейронах при
торможении их активности

Длительность воздействия, мин.	Число нейронов	Среднее содержание белков, пр	% к контролю и значимость отличия (P)
Нейроны ядра Дейтерса			
Контроль	313	$\frac{423 \pm 14}{5501 \pm 173}$	—
2	159	$\frac{385 \pm 23}{4672 \pm 214}$	$\frac{91,0}{84,1}$ $P < 0,01$
10	166	$\frac{307 \pm 14}{4532 \pm 188}$	$\frac{72,6}{82,4}$ $P < 0,001, P < 0,01$
30	154	$\frac{359 \pm 17}{4470 \pm 187}$	$\frac{84,9}{81,3}$ $P < 0,01$
Спинальные мотонейроны			
Контроль	170	$\frac{212 \pm 8}{13687 \pm 307}$	—
10	170	$\frac{190 \pm 7}{11183 \pm 306}$	$\frac{89,6}{86,3}$ $P < 0,05, P < 0,01$

Примечание. Над чертой — данные для ядра, под чертой — для цитоплазмы.

Величина сдвига нарастала при поляризации длительностью до 10 мин. Через 30 мин. после начала опыта в ядре нейронов отмечалась тенденция к нормализации, а в цитоплазме содержание белков практически оставалось на том же уровне, что и при 10-минутной поляризации.

В описанных опытах характер активности исследуемых нейронов не регистрировали. Представлялось необходимым выполнить эксперименты, в которых наличие торможения нейронов контролировалось бы электрофизиологически. С этой целью провели вторую серию опытов на половозрелых самках кошек. У подопытных животных под нембуталовым наркозом стимулировали левое гигантоклеточное ядро ретикулярной формации продолговатого мозга импульсами тока (0,1—0,2 мсек., 200 имп/сек), добиваясь полного торможения моно- и полисинаптических рефлекторных реакций в ядрах флексорных и экстензорных мотонейронов поясничного утолщения спинного мозга. Установлено^(8,9), что торможение спинальных рефлекторных реакций, возникающее при раздражении ретикулярной формации ствола мозга, является постсинаптическим: оно сопровождается выраженной гиперполяризацией мембраны флексорных и

экстензорных мотонейронов в пояснично-крестцовом отделе спинного мозга. О наличии торможения судили по уменьшению амплитуды моно- и полисинантических ответов, которые регистрировали с передних корешков после нанесения редких (1 в 10 сек.) тестирующих стимулов на центральные концы перерезанных афферентных нервов левой задней лапы. Длительность стимуляции гигантоклеточного ядра составила 10 мин., поскольку при более продолжительном воздействии не удавалось получить полного торможения рефлекторных разрядов в передних корешках спинного мозга.

Для цитохимического анализа взяли 3 подопытных и 3 контрольных кошки, причем у последних проделывали все те же манипуляции, что и у подопытных, за исключением раздражения гигантоклеточного ядра. Животных забивали внутривенным введением нембутала. В поясничном утолщении их спинного мозга обследовали альфа-мотонейроны вентrolатерального ядра левого переднего рога сегментов L₅ — L₆. Было обнаружено (табл. 1), что торможение активности спинальных мотонейронов, как и нейронов ядра Дейтерса, приводит к отчетливому понижению содержания белков в их ядре и цитоплазме.

Совпадение результатов опытов, выполненных на двух разных объектах, позволяет заключить, что процесс торможения нейронов цитохимически проявляется в уменьшении количества нейрональных белков. Здесь уместно напомнить данные других исследователей (^{1, 10-12}) о возрастании содержания белков в нервных клетках при их возбуждении. Противоположная направленность изменений количества белков в возбужденных и заторможенных нейронах наводит на мысль о возможных факторах, являющихся сигналом для возникновения этих цитохимических сдвигов. Такими факторами могут служить медиаторы или ионы, которые оказывают регулирующее влияние на метаболизм нейрональных белков (^{13, 14}). Не исключено, что разный биохимический эффект возбуждающих и тормозных медиаторов или же различные колебания внутриклеточной концентрации ионов при возбуждении и торможении ответственны за формирование противоположно направленных сдвигов содержания нейрональных белков в условиях преобладания одного из основных нервных процессов.

В качестве механизмов, определяющих уменьшение количества белков в нейроне при торможении, следует учитывать: а) угнетение синтеза белков, б) возрастание распада белков и в) ускорение транспорта белков по аксону. Исходя из современных представлений о скорости обмена белков в нервной ткани (^{2, 3}), кажется маловероятным, чтобы столь значительная и быстрая потеря нейрональных белков была обусловлена угнетением их синтеза. Что же касается распада белков, то в пользу этого механизма говорят наблюдения о развитии такого процесса в стимулированной нервной ткани (³), а также данные о наличии деструктивной фазы метаболизма белков функционирующего нейрона (¹). Однако трудно представить биологический смысл усиления распада белков в заторможенных нейронах. Вряд ли торможение вызывает более выраженное по сравнению с возбуждением «изнашивание» структурных и ферментных белков. Поэтому куда более реально предположение об усиленном выделении белка из тела нейрона в аксон во время торможения, тем более, что возникновение подобных изменений в случае деятельного состояния нейронов доказано экспериментально (¹²). Поскольку в настоящей работе применялись относительно кратковременные воздействия, можно думать о миграции в аксон быстро движущихся белков. Последнее соображение подтверждается тем, что 80% быстро транспортируемых белков составляют нерастворимые белки (¹⁵), а именно их количество и определялось в основном при интерферометрии фиксированных нервных клеток. Если во время постсинаптического торможения содержание белков в цитоплазме и ядре нейрона действительно снижается вследствие быстрого перемещения бел-

ковых веществ в аксон, то процесс торможения должен способствовать замещению макромолекул и органелл, распад которых происходит ⁽¹⁵⁾ при нормальной функции синапса.

Авторы благодарят Е. В. Максимову и В. М. Мешмана за проведение физиологических экспериментов.

Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
19 XI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Я. Бродский, Трофика клетки, «Наука», 1966, стр. 355. ² В. Droz, Int. Rev. Cytol., 25, 363 (1969). ³ B. Jakoubek, B. Semingiovsky, Int. Rev. Neurobiol., 13, 255 (1970). ⁴ Yu. Ya. Geinisman, Brain Res., 26, 2, 235 (1971). ⁵ R. V. Vito, A. Brusa, A. Arduini, J. Neurophysiol., 19, 2, 241 (1956). ⁶ Г. И. Горгиладзе, В кн.: Физиология вестибулярного анализатора, М., 1968, стр. 97. ⁷ М. Ito, T. Hongo, Y. Okada, Exp. Brain Res., 7, 3, 214 (1969). ⁸ R. Llinas, C. A. Terzuolo, J. Neurophysiol., 28, 2, 413 (1965). ⁹ А. И. Шаповалов, В кн.: Синаптические процессы, Киев, 1968, стр. 215. ¹⁰ Н. Нуден, A. Pigon, J. Neurochem., 6, 1, 57 (1960). ¹¹ Л. З. Певзнер, Цитология, 7, 2, 253 (1965). ¹² В. Я. Бродский, А. М. Арефьева, Цитология, 10, 3, 329 (1968). ¹³ Н. Н. Демин, В кн.: Проблемы нейрохимии, М.—Л., 1966, стр. 197. ¹⁴ S. Roberts, C. E. Zomzely, In: Protides of the Biological Fluids, Amsterdam, 1966, 13, p. 91. ¹⁵ J. S. Elam, B. W. Agranoff, J. Neurochem., 18, 3, 375 (1971).