

А. Г. БРАГИН, О. С. ВИНОГРАДОВА, В. И. КУЗНЕЦОВ, А. Т. БОРТНИК

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ АУТОИММУНИЗАЦИИ НА ЗУБЧАТУЮ ФАССИЮ ГИППОКАМПА

(Представлено академиком М. Н. Ливановым 16 IV 1974)

Структуры гиппокамповой формации в последнее время привлекают все большее внимание исследователей в связи с распространением представлений об их участии в процессах обучения и памяти. Одной из этих структур является зубчатая фасция (з.ф.), строение и связи которой детально изучены, а функции остаются полностью неизвестными. Это в первую очередь объясняется морфологическими особенностями з.ф., которые делают невозможным ее избирательное разрушение хирургическими методами.

Несомненно, однако, что з.ф. должна играть чрезвычайно важную роль в работе нейронов regio inferior гиппокампа. На дендритах ее гранулярных клеток заканчивается основная масса волокон, поступающих по перфорирующему пути от энторинальной коры, которая, в свою очередь, получает афференты от высших неокортикальных областей (1). Аксоны клеток з.ф. (мшистые волокна) заканчиваются гигантскими синапсами (3—6 мкм в диаметре) на сложных шипиках проксимальных сегментов апикальных дендритов пирамидных нейронов полей CA<sub>3-4</sub> гиппокампа. Таким образом, з.ф. является внутригиппокампальным реле кортикального входа для полей CA<sub>3-4</sub>.

В нейрофизиологических опытах было показано, что синапсы з.ф. обладают особыми пластическими свойствами и способны длительно (1—3 дня) сохранять потенцированное состояние (2). Потенциация кортикального входа гиппокампа через з.ф. при электрической стимуляции приводит к ускорению угашения и подавлению реакций нейронов поля CA<sub>3</sub> на сенсорные раздражители (3, 4).

Помимо своей необычной для к.п.с. величины и способности к длительной потенциации, синапсы клеток з.ф. обладают уникальными биохимическими свойствами. Как показывают гистохимические и автордиографические исследования, в них в высокой концентрации содержится цинк (5, 6). Цинк выявляется в синаптических пузырьках гигантских синапсов, что служит основанием для предположений об его участии в функции синаптической передачи (7, 8). Химический медиатор этой системы остается неизвестным; высказывались предположения о том, что им может быть ацетилхолин (9) или глутамат (10), однако прямых доказательств не существует. Биохимическими исследованиями было показано, что цинк в з.ф. находится в комплексе с кислым белком (9). Химическая специфичность синапсов з.ф. служила основанием для попыток выключить их посредством различных веществ, связывающих тяжелые металлы (дитизон (11), диэтилдитиокарбомат (12), H<sub>2</sub>S (13)). Однако эти вещества, во-первых, неспецифичны в отношении цинка и, во-вторых, обладают общим токсическим действием, что ограничивает возможность использования их в физиологических опытах.

Поэтому нами была предпринята попытка устранения влияний з.ф. на клетки гиппокампа у кролика с помощью метода аутоиммунизации. З.ф. кролика отделяли от гиппокампа под лупой при 4°. Выделенную ткань использовали сразу или хранили в замороженном состоянии. Ткань одной з.ф. (100 мг) измельчалась и смешивалась с равным объемом адьюванта

Фрейнда (БЦЖ и вазелиновое масло в соотношении 2:1) до получения эмульсии. Каждый кролик-реципиент получал две подкожных инъекции с недельным интервалом. Контрольным животным вводили равные объемы гомогената неокортекса или хвостатого ядра.

Через 1 мес. после последней инъекции кроликов оперировали под наркозом, устанавливая на черепе над координатами поля  $CA_3$  втулку для держателя дистанционного гидравлического манипулятора. Через три дня начинали экстраклеточное отведение активности пирамидных клеток поля  $CA_3$  посредством вольфрамовых электродов с диаметром кончика 3 мкм. Тестом в опытах служила скорость угасания реакций нейронов на сенсорные раздражители (преимущественно — звуковые тоны), подаваемые ритмическими сериями (длительность раздражителя 1 сек., интервал 5 сек.; число раздражителей в серии 30—60). В дальнейшем полученные записи на киноплёнке оценивались «слепым методом». При каждом применении раздражителя определялись наличие (+) или отсутствие (—) реакции. Далее обработка проводилась отдельно для 4 групп животных: 1 — норма (без введения гомогената, группа «Н»); 2 — животные с введением гомогената хвостатого ядра (группа «х.я.»); 3 — экспериментальная группа с введением гомогената з.ф. (группа «з.ф.»). Дополнительно такой же обработке были подвергнуты записи нейронной активности животных, у которых в течение нескольких дней производилась систематическая электрическая стимуляция з.ф. через вживленные биполярные электроды (группа «с»). Для всех нейронов животных одной группы определяли процент реакций при 1-м, 2-м, и т. д. — до 60-го применения сенсорного раздражителя. На основании этих показателей строили усредненные графики угашения реакций. Достоверность наблюдавшихся различий определялась по критерию Вилкоксона.

После записи 10—15 нейронов кролика декапитуировали и выделяли мозг для выявления антител на введенную структуру мозга. Применяли методы прямой и непрямой иммунофлуоресценции (<sup>13</sup>, <sup>14</sup>). Замороженные срезы инкубировали 30 мин. с ослиной сывороткой против глобулинов кролика, меченной ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианат), разведенной в отношении 1:4 или 1:8. В случае непрямой флуоресценции этому предшествовала инкубация срезов с сывороткой реципиента. Затем срезы заключали в забуференный глицерин и просматривали в люминесцентном микроскопе МЛ-2.

Многие работы, посвященные исследованию антител на введение ткани гомологичного животного (<sup>14—16</sup>), в частности ткани головного и спинного мозга или периферических нервов (<sup>17</sup>, <sup>18</sup>), отмечают трудность обнаружения специфических антител. В нашей работе визуально под микроскопом обнаруживалось более яркое свечение той структуры мозга, гомогенат которой вводили (з.ф., гиппокампа или хвостатого ядра), по сравнению с соседними структурами, но различия в интенсивности свечения были недостаточны для получения убедительных микрофотографий. Возможно, причиной является низкий титр аутоантител.

Однако в физиологической части работы были получены весьма отчетливые данные. В норме (группа «н») применение серий сенсорных раздражителей приводит к угашению реакции нейронов поля  $CA_3$  в пределах двух первых десятков повторений. Группа «х.я.» по всем показателям, в том числе по параметру угашения реакций нейронов поля  $CA_3$ , практически не отличалась от нормы: в этом случае также наблюдался быстро идущий, линейный процесс угашения (различия незначительны,  $P > 0,05$ ). У кроликов группы «з.ф.» характер спонтанной активности нейронов поля  $CA_3$ , тип и знак реакций и исходный уровень реактивности к сенсорным раздражителям были такими же, как у группы «н». Сохранялись выраженные активационные и тормозные реакции тонического типа, характерные для поля  $CA_3$ . Уровень реактивности, в норме составлявший 63%, у группы «з.ф.» равнялся 62,7%. Однако реакции теряли способность

к угашению (рис. 1). При повторных применениях блоков по 30–60 раздражителей наблюдалась лишь слабо выраженная тенденция к снижению числа реакций, но статистически достоверных различий по уровню реактивности между началом и концом серий не было выявлено. На рис. 2 показаны быстро спадающие до нуля кривые угашения для групп «н» и «х.я.» и кривая группы «з.ф.», идущая почти параллельно оси абсцисс (различия кривых для «н» и «з.ф.» достоверны при  $P < 0,01$ ). На графике приведена также кривая угашения сенсорных реакций нейронов поля  $CA_3$  у животных, подвергавшихся электрической стимуляции з.ф. (группа «с»). Реактивность клеток поля  $CA_3$  в этом случае существенно снижалась (до 25%), а у реагирующих клеток реакции были слабыми и быстро подавлялись. Кривая угашения при этом отражает ускорение процесса по сравнению с нормой (различия для «н» и «с» достоверны при  $P = 0,01$ ).

Таким образом, хотя мы не получили прямых подтверждений наличия специфической аутоиммунной реакции при введении гомогената э.ф., физиологические данные показывают, что эта процедура приводит к существенным изменениям динамических свойств ответов нейронов в поле  $CA_3$ , причем эти изменения идут в направлении, противо-

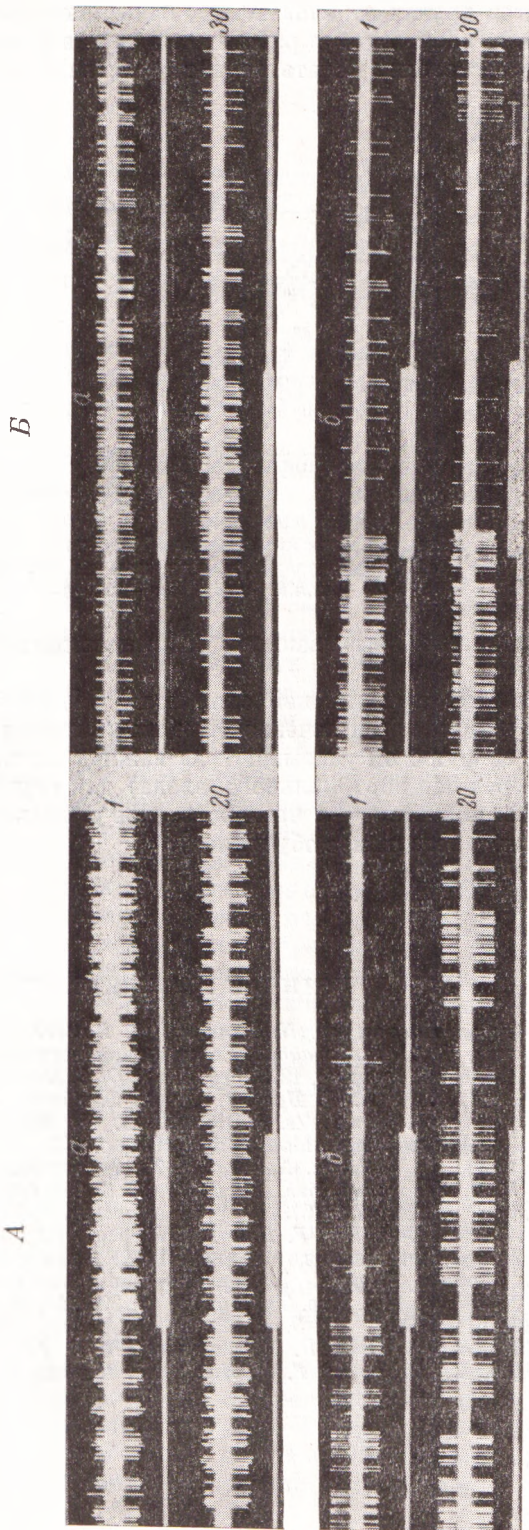


Рис. 1. Характер реакций нейронов поля  $CA_3$  гиппокампа на сенсорные раздражители. А — контроль, Б — последние аутоиммунизации тканью зубчатой фации. а — ответы нейронов с активационными и б — с тормозными реакциями. 1, 20, 30 — первый, двадцатый и тридцатый предъявляемые раздражители. Калибровка времени 200 мсек.

положном тому, которое наблюдается при экспериментальном повышении активности з.ф. Функциональные сдвиги, не возникающие при введении гомогенатов других отделов мозга, позволяют предполагать наличие специфических нарушений в работе нейронов з.ф. или ее синаптических систем. Это заставляет искать другие средства и методы обнаружения анти-

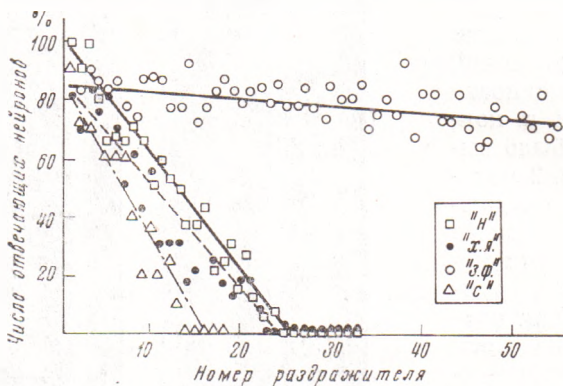


Рис. 2. Динамика реакций нейронов поля CA<sub>3</sub> на сенсорные раздражители при их повторении. «н», «х.я.», «з.ф.», «с» — см. в тексте

тел или антигенов, вызывающих наблюдавшиеся функциональные изменения.

Подавление реакций нейронов поля CA<sub>3</sub> на сенсорные раздражители при стимуляции з.ф. и исчезновение их угашения при предполагаемом нарушении ее функций указывают на важное значение з.ф. (и переключающегося через нее кортикального входа) для осуществления пластических функций гиппокампа — в частности, для угашения реакций на новые раздражители («негативное обучение»).

Институт биофизики  
Академии наук СССР  
Пушино-на-Оке

Поступило  
16 IV 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> G. W. von Hoese, D. N. Pandya, N. Butters, Science, v. 175, 1471 (1972).
- <sup>2</sup> А. Г. Брагин, О. С. Виноградова, Сборн. Физиологические механизмы памяти, под ред. Е. А. Громовой, Пушино, 1973, стр. 8. <sup>3</sup> О. С. Виноградова, К. И. Дудаева, ДАН, т. 202, 241 (1972). <sup>4</sup> А. Г. Брагин, Сборн. Лимбическая система мозга, Пушино, 1973, стр. 141. <sup>5</sup> F. Timm, Zs. Zellforsch., v. 48, 548 (1958). <sup>6</sup> C. von Euler. In: Physiologie de l'hippocampe, Montpellier, 1962, p. 135. <sup>7</sup> F.-M. S. Haug, Histochemie, v. 8, 355 (1967). <sup>8</sup> Y. Iwata, N. Otsuka, Zs. Zellforsch., v. 91, 547 (1968). <sup>9</sup> В. И. Кузнецов, В. И. Новоселов, Изв. АН СССР, № 6, 892 (1972). <sup>10</sup> I. L. Crawford, J. D. Connor, Nature, v. 244, 442 (1973). <sup>11</sup> G. Danscher, F.-M. S. Haug, Histochemie, v. 28, 211 (1971). <sup>12</sup> G. Danscher, F. Haug, K. Fredens, Exp. Brain Res., v. 16, 521 (1973).
- <sup>13</sup> Иммунохимический анализ, под ред. Л. А. Зильбера, М., 1968. <sup>14</sup> R. C. Nairn, Fluorescent Protein Tracing, Livingstone — Edinburgh — London (1962). <sup>15</sup> В. Н. Waksman, J. Neuropathol. Exp. Therapy, v. 15, 293 (1956). <sup>16</sup> В. Н. Waksman, J. Exp. Med., v. 109, 311 (1959). <sup>17</sup> Э. И. Кэбот, М. Мейер, Экспериментальная иммунохимия, М., 1968, стр. 312. <sup>18</sup> В. Н. Waksman, R. D. Adams, J. Exp. Med., v. 102, 213 (1955). <sup>19</sup> G. M. Mackenzie, F. M. Hauger, J. Immunol., v. 13, 41 (1927).