

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
ИНИ НОРМАЛЬНОЙ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. П.К. АНОХИНА РАМН**

На правах рукописи

УДК 612.822.3+612.821.6

**Солнцева
Светлана Вячеславовна**

**НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И
НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
КОНСОЛИДАЦИИ И РЕКОНСОЛИДАЦИИ
АССОЦИАТИВНОГО АВЕРСИВНОГО НАВЫКА
НА ПИЩУ У ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ**

03.03.01 – физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской Академии медицинских наук
НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина в лаборатории функциональной
нейрохимии (заведующий - доктор медицинских наук, профессор Владимир
Вячеславович Шерстнев)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук Владимир Павлович Никитин

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Юрий Александрович Фадеев
Первый Московский Государственный Медицинский Университет
им. И.М. Сеченова

доктор биологических наук Игорь Сергеевич Захаров
Институт Биологии Развития им. Н.К.Кольцова РАН

Ведущая организация:

Биологический Факультет Московского Государственного Университета им.
М.В.Ломоносова

Защита состоится «10» ноября 2010 г. в 14⁰⁰ ч. на заседании
Диссертационного Ученого Совета Д 001.008.01 при Учреждении Российской
академии медицинских наук НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина
РАМН

Адрес: 125009, Москва, ул.Моховая, д.11, стр.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ НФ РАМН

Автореферат разослан

Ученый секретарь Диссертационного Совета
кандидат медицинских наук В. А. Гуменюк



2011А
2523

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Длительное время считалось, что сформировавшаяся долговременная память чрезвычайно устойчива к разнообразным воздействиям. Взгляд на обсуждаемую проблему стал меняться, когда были получены данные, свидетельствующие о возможности экспериментального нарушения памяти спустя значительный период времени после обучения. Было обнаружено, что после завершения периода консолидации долговременной памяти короткое предъявление животному одного из компонентов ситуации обучения может возвращать ее в состояние транзиторной пластичности, в котором она может быть модифицирована, изменена и даже стерта различными химическими или физическими воздействиями. (Misanin J.R., et al., 1968; Lewis D.J., Bregman N.J., 1973; Nader K., 2003, 2007; Sara S.J., et al., 2000, 2006; Dudai Y., 2004; Tronson C., et al., 2007). Процедура предъявления компонента обучения получила название «напоминание», а последующий процесс возврата долговременной памяти в лабильное состояние – реактивации и последующей реконсолидации памяти. Без процедуры напоминания реконсолидации памяти не происходило. Полагают, что реконсолидация служит в качестве адаптивного процесса, который позволяет к существующей памяти быстро добавлять новую информацию и ослаблять или усиливать определенные компоненты памяти (Sara S.J., 2000; Lee J.L., 2009).

В исследованиях, проведенных на различных видах животных, в том числе на моллюсках, с использованием разных форм обучения описан ряд особенностей динамики реконсолидации памяти, изучены некоторые поведенческие и нейрохимические механизмы, лежащие в основе этого процесса (Anokhin K.V., et al., 2002; Dudai Y., 2004; Sara S.J., 2006; Nader K., 2007). Выявлено, что реконсолидация памяти зависит от регуляторных внутриклеточных процессов (Izquierdo I., et al., 2002; Kelly A., et al., 2003); генетического аппарата нейронов (Bozon B., et al., 2003; Taubenfeld S.M., 2001; Da Silva W.C., et al., 2008); активности нейромедиаторных механизмов, и в частности, глутаматергической и моноаминоергической систем. Так, обнаружено, что рецепторы глутамата и моноаминов вовлечены в механизмы как консолидации так и реконсолидации различных видов памяти, в том числе и аверсивной вкусовой памяти (Pedreira M.E., et al., 2003; Summer M.J., et al., 2003; Suzuki A., et al., 2004; Cui Z., et al., 2005; Torres-Garcia M., et al., 2005; Akirav I., et al., 2006; Fellini L., et al., 2009). Обращено внимание как на сходство некоторых механизмов реконсолидации памяти с механизмами ее первичной консолидации, так и на существенное различие этих процессов (Taubenfeld S.M., et al., 2001; Cammarota M., et al., 2004; Salinska E., et al., 2004; Tronel S., et al., 2005; Milekic M.H., et al., 2007).

Приципиально важным аспектом обсуждаемой проблемы является вопрос о механизмах амнезии, возникающей при нарушении реконсолидации памяти. В настоящее время не сложилось единого мнения о процессах забывания. Некоторые авторы полагают, что отсутствие поведенческого проявления навыка после обучения может быть следствием нарушения процессов

воспроизведения и сохранная память перманентно или временно недоступна (Anokhin K.V., et al., 2002; Summer M.J., et al., 2003). Вторая возможная причина потери памяти заключается в том, что нарушение экспрессии памяти может отражать, скорее, ее отсутствие, чем недоступность (Nader K., et al., 2006).

Другими важными, однако, недостаточно исследованными проблемами реконсолидации следа памяти являются вопросы, касающиеся сходства и различия механизмов консолидации и реконсолидации определенных навыков, особенностей взаимоотношения сигнальной и обстановочной афферентации в процессе индукции реконсолидации, роли различных нейромедиаторных систем в механизмах реконсолидации. Практически не исследована динамика развития амнезии, возникающей при нарушении реконсолидации следа памяти.

Настоящая работа направлена на изучение этих принципиально важных вопросов обсуждаемой проблемы.

Цель и задачи исследования. Целью работы явилось изучение нейрофизиологических и нейрохимических механизмов консолидации и реконсолидации долговременного навыка отвергания определенного вида пищи у виноградной улитки. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить зависимость реконсолидации долговременной ассоциативной памяти на пищу от выраженности и длительности подавления процессов трансляции.

2. Исследовать особенности участия рецепторов NMDA глутамата и рецепторов серотонина в механизмах реконсолидации аверсивного навыка на пищу.

3. Изучить роль активации синтеза белковых молекул, а также рецепторов NMDA глутамата и рецепторов серотонина в механизмах консолидации ассоциативного навыка отвергания определенного вида пищи у улиток.

4. Исследовать роль обстановочной афферентации в механизмах реконсолидации аверсивного навыка на пищу у виноградных улиток.

5. Исследовать динамику развития амнезии, вызванной нарушением реконсолидации памяти антагонистами рецепторов нейромедиаторов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Амнезия, возникающая при нарушении реконсолидации аверсивного навыка на пищу, является развивающимся во времени процессом, который характеризуется возможностью восстановления памяти при повторном обучении на ранней стадии (до 10 дней) и отсутствием чувствительности к повторному обучению на поздней стадии амнезии.

2. При одной и той же форме ассоциативного обучения – отвергания улитками определенного вида пищи – различные нейромедиаторные рецепторы играют специфическую роль в механизмах

реконсолидации памяти и развития амнезии. Ингибирование рецепторов NMDA глутамата приводило к развитию необратимой амнезии, тогда как ингибирование рецепторов серотонина вызывало амнезию, обратимую при повторном обучении.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые обнаружено, что у улиток, обученных отверганию определенного вида пищи, нарушение реконсолидации долговременной памяти ингибиторами синтеза белка или антагонистами рецепторов нейромедиаторов приводит к развитию амнезии, сохраняющейся не менее 60 дней.

Впервые установлено, что амнезия, инициируемая нарушением реконсолидации долговременной памяти, является развивающимся во времени процессом, включающим две стадии. Ранняя стадия, продолжительностью менее 10 дней, характеризовалась возможностью восстановления памяти при повторном обучении отвергания того же вида пищи, что и при первоначальном обучении. Поздняя стадия амнезии, продолжительностью 10 дней и более, характеризовалась утратой способности животных к восстановлению памяти при повторном обучении.

Получены результаты, свидетельствующие о специфичности вовлечения нейромедиаторных механизмов в процессы реконсолидации долговременной памяти. При одном и том же виде обучения нарушение реконсолидации памяти антагонистами рецепторов NMDA глутамата приводило к развитию амнезии нечувствительной к повторному обучению, тогда как реконсолидация памяти во время действия антагониста рецепторов серотонина вызывала амнезию, обратимую повторным обучением.

Выявлены особенности молекулярных механизмов консолидации и реконсолидации следа памяти. Обнаружено, что нарушение синтеза белка как во время консолидации, так и реконсолидации долговременной памяти приводило к развитию необратимой амнезии, а антагонисты рецепторов серотонина в обоих случаях индуцировали амнезию, обратимую повторным обучением. Первичная выработка ассоциативного навыка отвергания пищи в условиях действия антагонистов рецепторов NMDA вызывала развитие обратимой амнезии, тогда как реконсолидация памяти во время действия этих антагонистов вызывала амнезию необратимую повторным обучением.

Показано, что для индукции процессов воспроизведения и реконсолидации долговременной памяти у улиток необходима интеграция возбуждений, вызываемых условным стимулом и обстановочной афферентацией. При изолированном действии обстановки обучения память не реактивируется.

Полученные нами результаты можно использовать при клиническом анализе механизмов амнезии, возникающей, в частности, при «острой» потере памяти различного генеза. Тактика коррекции нарушенной памяти терапевтическими процедурами или фармакологическими

препаратами может иметь существенные особенности в зависимости от вида амнезии (обратимая, необратимая) и стадий амнезии, вовлекающих различные молекулярные и клеточные механизмы.

Апробация диссертации. Основные материалы диссертационной работы доложены на итоговых конференциях ПНИИ Нормальной физиологии им. П.К.Анохина, РАМН (Москва 2005-2010 гг), I съезде физиологов СНГ (Сочи-Дагомыс, 2005), научной конференции «Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2005), международном симпозиуме «Механизмы адаптивного поведения» (Санкт-Петербург, Колтуши, 2005), VIII и IX региональных конференциях Международного общества нейробиологии беспозвоночных «Простые нервные системы» (Казань, 2006; Санкт-Петербург, 2009), XX съезде физиологического общества им. И.П.Павлова (Москва, 2007), FENS (Geneva 2008), «Neuroscience» (Chicago 2009).

Публикации: по материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 7 – статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа объемом 151 страница состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Диссертация иллюстрирована 18 рисунками. Список цитируемой литературы включает 323 источника.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на взрослых виноградных улитках *Helix lucorum*, крымской популяции. Животных содержали в холодильнике при температуре +6 С. Не менее чем за две недели до экспериментов улиток «активировали». Животных содержали в «домашних» боксах при комнатной температуре в условиях высокой влажности. Кормили улиток ежедневно сырой морковью. За 3 дня до обучения или тестирования навыков животных лишали пищи, доступ к воде не ограничивали.

Обучение отверганию определенного вида пищи. Процедуру обучения отверганию определенного вида пищи проводили по ранее разработанной методике (Максимова О.А., Балабан П.М., 1983). Улиток фиксировали за раковину к кронштейну таким образом, что животное могло относительно «свободно» перемещаться по пластиковому шару, плавающему в воде. В качестве условного стимула в большинстве экспериментов использовали банан, а в некоторых опытах - свежий огурец. В качестве дифференцировочного стимула применяли вареную морковь. Кусочек пищи (2-3 г), прикрепленный к одному из электродов, располагали на расстоянии 0,5 см от ротовой полости животного. Второй электрод находился в воде, омывающей шар. Подкрепляющим стимулом служило воздействие переменным электрическим током (50 Гц, 300 мс, 1,2 мА). Ток пропускали через пищу и тело улитки в момент первых консуматорных пищевых реакций (скребковое движение радулой по пище). Латентные периоды начала пищевых реакций регистрировали с помощью вебкамеры и компьютера. Если животные в течение 120 с не начинали

поедать пищу тест прекращали. Предъявление пищи осуществляли через каждые 15-20 мин. Условный стимул предъявляли 14-16 раз, дифференцировочный 8-10 раз. Проводили три сеанса обучения улиток - ежедневно, в течение 3-х дней. Латентные периоды консумматорных реакций на 3-й день обучения в ответ на последнее предъявление условного стимула составляли, как правило, более 100 с.

Процедура напоминания. Через 24 ч после обучения улиткам однократно инъецировали растворы исследуемых веществ и через 15-20 мин производили процедуру напоминания. Для этого животных помещали на пластиковые шары и предъявляли 3 раза условный стимул с интервалом 10-15 мин без подкрепления током. Продолжительность предъявления условного стимула ограничивали 120 с. Через 1 ч после предъявления первого напоминающего стимула улиток перемещали с шаров в «домашние» боксы.

Тестирование. Для тестирования навыка животных помещали в обстановку обучения и предъявляли условный и дифференцировочный стимулы с интервалом 10-15 мин и в течение 120 с измеряли латентные периоды консумматорных реакций. При тестировании подкрепляющий стимул не применяли.

Повторное обучение. Одним из экспериментальных «инструментов» исследования механизмов амнезии и, в частности, определения степени сохранности нарушенного памятного следа и доступности его для воспроизведения, является повторное обучение. При нарушении выработанного навыка отвергания пищи и развитии амнезии, у улиток проводили повторное обучение отвергания того же вида пищи, что и при первоначальном обучении. Навык вырабатывали в течение 1-3 дней, используя те же методы, что и при первичном обучении. Обучение прекращали, если латентные периоды консумматорных реакций достигали 100 с и более и эти же значения латентных периодов регистрировали на следующий день при первом предъявлении условного стимула.

Контрольные группы животных. Контрольных животных обучали навыку отвергания определенного вида пищи, используя вышеописанную методку. В большинстве экспериментов улиткам через 24 часа после процедуры обучения инъецировали исследуемые вещества, помещали в обстановку обучения на 1 час и не предъявляли напоминающих условных пищевых стимулов. В ряде опытов животным инъецировали физиологический раствор, помещали в обстановку обучения и предъявляли напоминающие стимулы.

Используемые растворы и вещества. Животным инъецировали растворы веществ в полость тела с помощью шприца через кожу средней части ноги. Используемые в экспериментах вещества разводили в физиологическом растворе для моллюсков в объеме 0,5 мл на улитку, следующего состава NaCl - 80 mM, CaCl(2H₂O) - 7 mM, KCl - 5 mM, MgCl₂(6H₂O) - 5 mM, TrisCl - 5 mM; pH - 7,6-7,8. Для подавления процессов трансляции использовали циклогексимид (cycloheximide), и анизомицин (anisomycin). Циклогексимид инъецировали улиткам в дозах 30 и

100 мг/кг веса, анизиомицин - 20 и 60 мг/кг веса. В исследованиях, проведенных на разных видах животных, в том числе и на моллюсках, указанные ингибиторы синтеза белка использовали в широком диапазоне доз от 20 до 210 мг/кг веса, в которых они подавляли синтез белка на 60-98% и влияли на процессы консолидации и реконсолидации памяти (Squire L.R., 1984; Montarolo P.G., et al., 1986; Child F.M., et al., 2003; Lattal K., et al., 2004; Gainutdinova T.H., et al., 2006).

Для изучения роли рецепторов серотонина в механизмах консолидации и реконсолидации памяти использовали неселективный антагонист метиотепин (methiothepin mesylate salt) в дозе 5 мг/кг веса. Метиотепин у моллюсков более эффективно влиял на различные нейрофизиологические процессы, чем другие антагонисты серотониновых рецепторов (Пивоваров А.С., и др., 2003; Barbas D., et al., 2003).

Для ингибирования активности рецепторов NMDA глутамата использовали специфический неконкурентный антагонист МК-801 (dizocilpine maleate) и конкурентный антагонист 2-амино5-фосфовалериат (APV). МК-801 инъецировали в дозе 0,20 мг/кг веса, а APV - 15 мг/кг веса. В указанных дозах эти вещества эффективно влияли на многие поведенческие навыки у млекопитающих и беспозвоночных (Литвин О.О., и др., 1998; Sara S. J., 2000; Pedreira M.E., et al., 2002).

Статистическая обработка данных. Экспериментальные данные усредняли и вычисляли стандартную ошибку средней. Сравнивали латентные периоды консумматорных реакций на предъявление условного и дифференцировочного пищевых стимулов, а также латентные периоды на условный стимул у животных контрольных и экспериментальных групп. Для оценки уровня достоверности различий использовали одюфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим апостериорным анализом по методу Тьюки для неравных групп (Tukey HSD for unequal N).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Действие ингибиторов синтеза белка перед процедурой напоминания вызывает транзиторную и устойчивую амнезию. Принципиально важной проблемой реконсолидации памяти является вопрос о продолжительности и устойчивости амнезии, возникающей при нарушении реконсолидации – является ли она транзиторной или происходит полное «стирание» памятного «следа»? Для решения этой проблемы необходимо исследовать молекулярные события, вовлекаемые в обеспечение процессов реконсолидации. Мы изучили особенности действия на эти процессы разных доз ингибиторов синтеза белка, а так же однократных или повторных их инъекций, вызывающих различное по выраженности и продолжительности подавление процессов трансляции (Davis H.P., Squire L.R., 1984).

1.1 Влияние однократного введения блокаторов синтеза белка циклогексимида или анизиомицина в «низкой» дозе на механизмы реконсолидации аверсивного условного рефлекса на пищу. Первой группе контрольных обученных животных (n=8) инъецировали по 0,5 мл

физраствора, помещали в обстановку обучения и предъявляли 3 напоминающих стимула (банан). Вторую и третью группы контрольных животных после инъекции аннзимицина (20 мг/кг) (n=11) или циклогексимида (30 мг/кг) (n=18) помещали в обстановку обучения, но не предъявляли напоминающих стимулов. Тестировали сохранность условной реакции через каждый час в течение 6-8 ч. У всех групп контрольных животных латентные периоды первых жевательных движений на бапан сохранялись на уровне свыше 100 сек в течение всего опыта (рис. 1) и они значительно превышали таковые на предъявление дифференцировочного стимула ($p < 0,0001$), что свидетельствует о сохранности выработанного навыка.

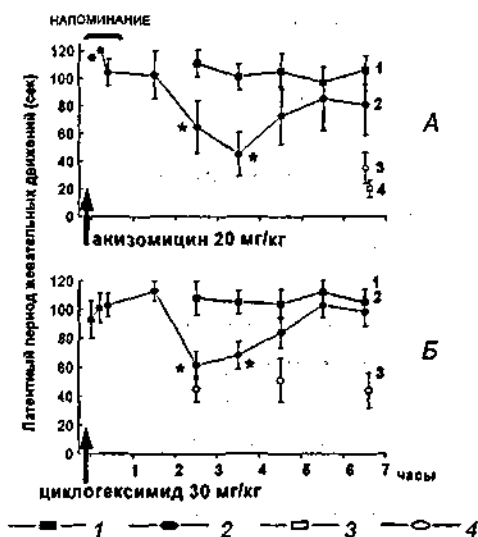


Рис. 1 Влияние введения однократных инъекций «низких» доз ингибиторов синтеза белка перед процедурой напоминания на воспроизведение навыка отвергания пищи у улитки. А и Б - улитки, которым инъекцировали аннзимицин и циклогексимид соответственно. 1 - условные реакции улиток, которым не предъявляли напоминающего стимула. 2 - реакции улиток, которым трижды предъявляли напоминающий стимул - банан. 3 и 4 - ответы на дифференцировочный стимул (вареную морковь) По оси ординат - латентные периоды начала жевательных движений, в секундах. По оси абсцисс - время эксперимента в часах. Стрелка - момент введения улиткам растворов. * - $p < 0,05$, по отношению к данным 1-х графиков.

Животным экспериментальных групп через 24 ч после обучения инъекцировали раствор циклогексимида (n=18) в дозе 30 мг/кг на улитку (рис. 1) или аннзимицина (n=12) в дозе 20 мг/кг помещали в обстановку обучения и предъявляли напоминающие стимулы. Тестировали сохранность навыка так же как у контрольных животных. Через 2,5 ч после начала процедуры напоминания обнаружено нарушение воспроизведения выработанного навыка, о чем свидетельствует уменьшение латентных периодов консумматорных реакций на предъявление банана - до 65 ± 15 с при инъекции циклогексимида и до 58 ± 12 с при введении аннзимицина. Эти значения достоверно ниже, чем у животных контрольных групп ($p < 0,005$). Латентные периоды реакций на условный стимул восстанавливались до уровня контроля через 4,5-5 ч после напоминания и в последующее время до окончания эксперимента сохранялись на этом уровне. Таким образом, однократные инъекции относительно низких доз ингибиторов синтеза белка и трехкратное предъявление животным условного стимула, приводили к транзиторному нарушению воспроизведения навыка отвергания пищи, сохранявшемуся около 2-3 ч.

1.2 Влияние трехкратного введения циклогексимида в «низкой» дозе или однократного введения циклогексимида или анизомидина в «высокой» дозе на механизмы реконсолидации аверсивного условного рефлекса на пищу. Первой группе контрольных улиток ($n=8$) через 24 ч после обучения трижды через каждые 2 ч инъецировали физраствор с процедурой напоминания после каждой инъекции. Животным второй контрольной группы ($n=11$) трижды через каждые 2 ч вводили циклогексимид (30 мг/кг) без последующего напоминания. Улиткам третьей ($n=7$) и четвертой ($n=9$) контрольных групп однократно вводили соответственно циклогексимид в дозе 100 мг/кг или анизомидин (60 мг/кг) без процедуры напоминания. Улиткам пятой ($n=8$) контрольной группы однократно инъецировали физраствор и трижды предъявляли напоминающий стимул. Улиток тестировали на протяжении 8 ч каждый час в течение первого дня эксперимента, а также через 1, 10, 15 и 60 дней. У животных всех контрольных групп латентные периоды первых консумматорных реакций на предъявление банана сохранялись около 100 с в течение всего периода тестирования, они значительно превышали латентные периоды на предъявление вареной моркови ($p<0.0001$), что свидетельствует о сохранности выработанного навыка.

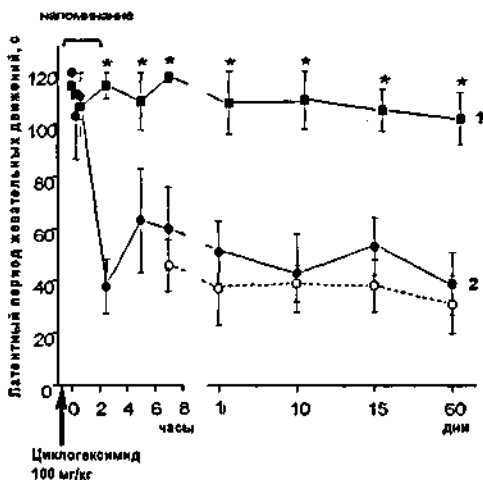


Рис. 2. Влияние однократной инъекции циклогексимида в «высокой» дозе перед напоминанием на воспроизведение навыка отвержения пищи. 1 — реакции улиток, которым однократно вводили физраствор и трижды предъявляли напоминающий стимул. 2 — реакции улиток, которым однократно вводили по 100 мг/кг циклогексимида и трижды предъявляли напоминающий стимул. Остальные обозначения как на рис. 1.

Животным первой экспериментальной группы ($n=17$) через 24 ч после обучения трижды через каждые 2 ч инъецировали по 30 мг/кг циклогексимида и после каждой инъекции проводили процедуру напоминания. Животным второй и третьей ($n=9$) экспериментальных групп однократно инъецировали по 100 мг/кг циклогексимида (рис. 2) или по 60 мг/кг анизомидина и проводили процедуру напоминания. Тестирование сохранности навыка проводили также как у контрольных животных. У животных всех экспериментальных групп через 2,5 ч после первого напоминания обнаружено нарушение воспроизведения навыка, которое сохранялось не менее 60 дней. Латентные периоды реакций на условный стимул у экспериментальных животных были

значительно меньше ($p < 0,0001$) таковых у контрольных улиток и не отличались ($p > 0,05$) от латентных периодов ответов на дифференцировочный стимул (рис. 2). Для определения степени сохранности следа памяти у группы животных ($n=11$), демонстрировавших амнезию в течение 1 месяца, проводили повторную выработку навыка. Повторное обучение в течение 3-х дней отверганию того же вида пищи, что и при первоначальном обучении (банана) не приводило к формированию навыка. Тестирование через 10 дней после повторного обучения (41 день после напоминовения) не выявило различий в латентных периодах ответов на условный и дифференцировочный стимулы ($p < 0,05$) (рис. 3). Вместе с тем количество сочетанных предъявлений условного и подкрепляющего стимулов при повторном обучении было больше, чем при первоначальном обучении ($9,7 \pm 1,0$ и $7,1 \pm 0,8$ соответственно; $p < 0,01$). Важно отметить, что у этой же группы улиток формировался навык отвергания нового для них вида пищи - свежего огурца на 37-38 дни после индукции амнезии. При этом количество сочетанных предъявлений пищевого и подкрепляющего стимулов при обучении пищевой аверсии на свежий огурец и банан при первоначальном обучении достоверно не отличались и составляли $7,5 \pm 0$, и $7,1 \pm 0,8$ соответственно ($p > 0,05$).

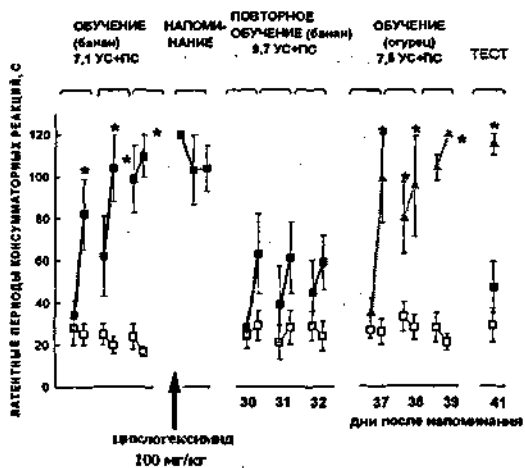


Рис. 3. Повторное обучение после нарушения реконсолидации памяти циклогексимидами.

В верхней части рисунка — схема эксперимента

- — ответы улиток на предъявление условного пищевого стимула (банана).
 - — ответы улиток на предъявление дифференцировочного стимула (зрелой моркови).
 - ▲ — ответы улиток на предъявление «нового» условного пищевого стимула (свежего огурца).
 - * — $p < 0,05$ (по отношению к дифференцировочному стимулу).
- Остальные обозначения как на рис. 1.

Таким образом, при нарушении реконсолидации навыка отвергания определенного вида пищи при трехкратном введении циклогексимида в «низкой» дозе или однократном введении циклогексимида или анизиомицила в «высокой» дозе у улиток формировалась устойчивая амнезия, которая сохранялась не менее 60 дней. Согласно общепринятым представлениям развитие амнезии после нарушения долговременной памяти может являться следствием либо подавления процессов воспроизведения, либо «стирания» следа памяти, что не исключает возможности формирования того

же навыка при повторном обучении. Однако, нами обнаружен новый, ранее в литературе не описанный феномен - повторное обучение отверганию условного стимула, который использовался при первичном обучении не приводило к формированию навыка. Эффект был специфичен, так как динамика формирования памяти на новый вид пищи (огурец) у этих улиток была сходна с таковой при их первоначальном обучении отверганию банана.

2. Антагонисты рецепторов серотонина и рецепторов NMDA глутамата избирательно нарушают реконсолидацию ассоциативной памяти. В литературных источниках имеются указания на то, что глутаматергическая система важна для консолидации и стабилизации ряда форм памяти, тогда как моноаминергические системы вовлекаются преимущественно в механизмы модуляции этих процессов (Базян А.С., Григорян Г.А., 2006; Robbins T.W., Murphy E.R., 2006). Мы предположили, что указанные медиаторные системы играют также различную роль в процессах реконсолидации следа памяти. В этой связи мы исследовали особенности участия рецепторов серотонина и NMDA рецепторов глутамата в процессах реконсолидации долговременного ассоциативного навыка отвергания определенного вида пищи у виноградной улитки.

2.1 Влияние антагониста рецепторов серотонина метиотепина на механизмы реконсолидации аверсивного условного рефлекса на пищу. Контрольной группе животных ($n=8$) через 24 ч после обучения инъектировали метиотепин, помещали на 1 ч в обстановку обучения, но напоминающих стимулов не предъявляли. У этих животных при тестировании через 2 и 3 ч, а также 15 дней латентные периоды консуматорных реакций на предъявление условного стимула сохранялись на уровне около 100 с.

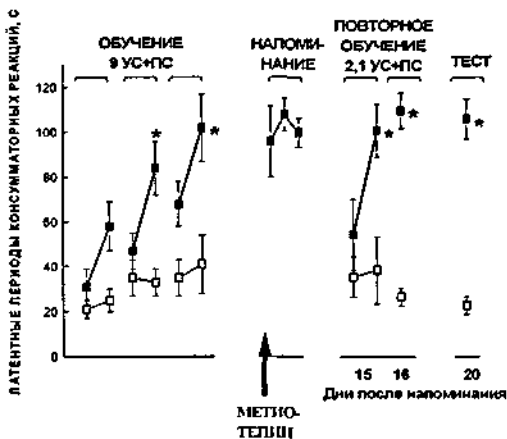


Рис. 4 Влияние метиотепина на реконсолидацию аверсивного условного рефлекса на пищу.

В верхней части рисунка — схема эксперимента. Темные и светлые квадраты — ответы улиток на предъявление условного и дифференцировочного стимулов соответственно.

Стрелка — момент инъекций метиотепина.

* - $p < 0,05$ (по отношению к дифференцировочному стимулу).

Остальные обозначения как на рис. 1.

Улиткам экспериментальной группы ($n=16$) вводили метиопетин, помещали на шары, и предъявляли напоминающие условные стимулы. При тестировании сохранности навыка обнаружено, что через 3 ч и 15 дней после действия метиопетина/напоминания латентные периоды ответов на условный стимул уменьшались до уровня ответов на дифференцировочный стимул ($p>0,05$). Повторное обучение этой группы улиток приводило к быстрому восстановлению навыка (рис.4). Через 3 дня после повторного обучения латентные периоды ответов на условный стимул составляли 101 ± 13 с и не отличались от таковых у контрольных улиток ($p>0,05$). При этом количество сочетанных предъявлений пищевого и подкрепляющего стимулов составили $2,1\pm 0,6$ и $8,9\pm 0,9$, соответственно ($p<0,05$). Таким образом, нарушение процессов воспроизведения аверсивного навыка на пищу проявлялось через 3 ч после действия метиопетина/напоминания и сохранялось не менее 15 дней. При повторном обучении улиток навык восстанавливался.

2.2 Влияние антагонистов рецепторов NMDA глутамата МК-801 и APV на механизмы реконсолидации аверсивного условного рефлекса на пищу. Контрольным группам животных через 24 ч после обучения инъектировали МК-801 ($n=12$) или APV ($n=8$), затем их помещали в обстановку обучения на 1 ч, но напоминающих стимулов не предъявляли. При тестировании через 2, 3 ч и через 15 дней нарушений воспроизведения навыка не выявлено. Латентные периоды консуматорных реакций у обеих групп улиток составляли около 100 с и были больше, чем ответы на дифференцировочный стимул ($p>0,0001$).

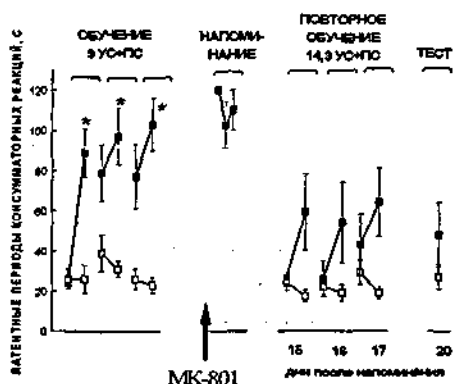


Рис. 6 Влияние МК-801 на механизмы реконсолидации аверсивного условного рефлекса на пищу. Обозначения как на рис. 1,4.

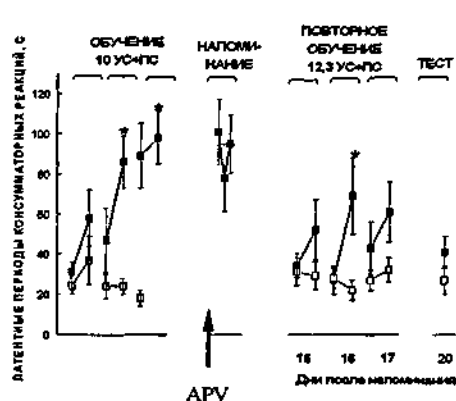


Рис. 6 Влияние APV на механизмы реконсолидации аверсивного условного рефлекса на пищу. Обозначения как на рис. 1,4.

Экспериментальным группам улиток вводили МК-801 ($n=21$) или APV ($n=16$), помещали в обстановку обучения и предъявляли три напоминающих стимула. Через 3 часа и 15 дней после

действия MK-801 или APV с последующим напоминанием обнаружено нарушение воспроизведения навыка - латентные периоды консумматорных реакций на условный и дифференцировочный стимулы не отличались ($p > 0,05$). Последующее повторное обучение улиток обеих групп не приводило к формированию навыка (рис 5; 6). Латентные периоды реакций на условный и дифференцировочный стимулы через 3 дня после повторного обучения достоверно не отличались ($p > 0,05$) и были значительно меньше, чем латентные периоды реакций на условный стимул у контрольных улиток ($p < 0,0001$). При этом животные получали большее количество сочетаний пищи и электротока, чем при первоначальном обучении. Таким образом, нарушение процессов воспроизведения аверсивного навыка на пищу возникало через 3 ч после действия антагонистов NMDA рецепторов и процедуры напоминания и сохранялось более 15 дней. При повторном обучении обнаружено подавление формирования навыка.

3. Нейромедиаторные и зависящие от синтеза белка механизмы консолидации ассоциативного аверсивного обучения на пищу. Постулат о том, что процессы реконсолидации могут быть сходными с процессами консолидации инициировал ряд работ, направленных на изучение специфических механизмов реконсолидации и консолидации памяти. (Taubenfeld S.M., et al., 2001; Kelli A., et al., 2003; Boccia M.M., et al., 2004; 2005). Высказывают мнение, что вызванная процедурой напоминания, реконсолидация «старой» памяти заключается в полной или частичной активации механизмов ее первичной консолидации (Sara S. J., 2000; Duvarci S., Nader K., 2004; Nader K., 2003; 2006; 2009). Однако, в настоящее время не сложилось однозначного мнения по данной проблеме. Исходя из представлений о том, что повторное обучение должно вовлекать механизмы консолидации следа памяти и в целях проведения сравнительного исследования этих механизмов, в следующей серии экспериментов мы изучали влияния ингибитора синтеза белка, а также антагонистов рецепторов NMDA глутамата и серотонина на механизмы первичной выработки ассоциативного навыка отвергания определенного вида пищи у виноградных улиток.

3.1 Контрольные группы животных. Улиткам контрольных групп ($n=32$) до или после каждого сеанса обучения вводили физраствор. К окончанию третьего дня обучения латентные периоды консумматорных реакций животных на предъявление условного пищевого стимула составляли около 100 с. Они сохранялись на этом уровне не менее 20 дней (рис. 7; 8; 9) и значительно превышали латентные периоды ответов на дифференцировочный стимул ($p > 0,0001$).

3.2 Влияние циклогексимида на механизмы консолидации аверсивного условного рефлекса на пищу. Улиткам ($n=8$) циклогексимид вводили после каждого сеанса обучения (рис.7). Латентные периоды консумматорных реакций на предъявление условного стимула на 3-й день обучения были меньше таковых у контрольных улиток ($p < 0,05$), а количество сочетательных предъявлений условного и подкрепляющего стимулов было больше, чем в контроле ($12,5 \pm 0,7$ и $8,7 \pm 0,9$ соответственно; $p < 0,05$). При тестировании навыка через 15 дней после обучения латентные периоды ответов на условный стимул не отличались от латентных периодов

консумматорных реакций на предъявление дифференцировочного стимула ($p < 0,0003$). Последующее повторное обучение не приводило к формированию навыка – через 3 дня после повторного обучения латентные периоды на условный и дифференцировочный стимулы не отличались (33 ± 8 с и 24 ± 4 с соответственно; $p > 0,5$) и были значительно меньше латентных периодов на условный стимул у контрольных животных (102 ± 11 с; $p < 0,00001$). В то же время введение циклогексимида перед каждым сеансом обучения не оказывало влияния на динамику выработки ассоциативного аверсивного навыка на пищу и на его последующее воспроизведение. Таким образом, введение циклогексимида после каждого сеанса обучения приводило к нарушению первоначальной выработки навыка, а так же подавлению формирования навыка при повторном обучении.

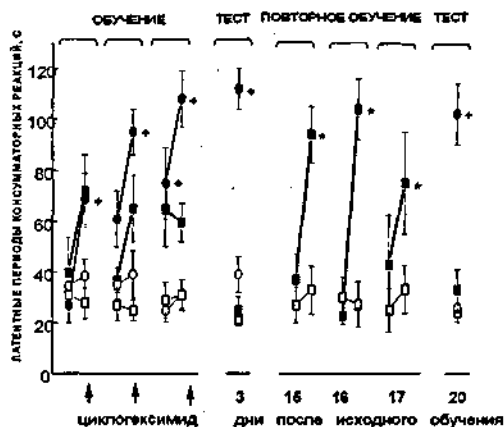


Рис. 7 Влияние циклогексимида, вводимого после каждого сеанса обучения, на выработку и сохранение ассоциативного навыка отверженной пищи. В верхней части рисунка – схема эксперимента. 1 и 2 – реакции на предъявление условных стимулов у животных, которым вводили циклогексимид (экспериментальная группа) и фиграстор (контрольная группа) соответственно. 3 и 4 – ответы на дифференцировочный стимул у экспериментальных и контрольных улиток соответственно.

Стрелки – моменты инъекций циклогексимида или фиграстора.

* и + - $p < 0,05$ по отношению к латентным периодам реакций на дифференцировочный стимул. Остальные обозначения как на рис. 1.

—■— 1 —●— 2 —□— 3 —○— 4

3.3 Влияние метиопетина и МК-801 на механизмы консолидации аверсивного условного рефлекса на пищу. Динамика выработки ассоциативного аверсивного навыка на пищу у улиток, которым перед каждым сеансом обучения вводили метиопетин ($n=8$) или МК-801 ($n=8$) достоверно не отличалась от таковой у контрольных животных (рис. 8; 9). Однако при тестировании через 3 и 15 дней после первоначального обучения улитки демонстрировали нарушение воспроизведения навыка, о чем свидетельствует отсутствие различий латентных периодов консумматорных реакций на условный и дифференцировочный стимулы ($p > 0,05$). Последующее повторное обучение улиток приводило к восстановлению навыка. При этом количество сочтанных предъявлений условного и подкрепляющего стимулов у улиток, исходно обученных во время действия метиопетина и МК-801, составило $2,1 \pm 0,5$ и $5,1 \pm 0,7$ соответственно. При тестировании через 20 дней после первоначального обучения латентные периоды ответов на условный стимул не отличались от таковых у контрольных животных ($p > 0,5$) и были существенно больше латентных периодов

реакций на дифференцировочный стимул ($p < 0,00001$). Таким образом, выработка навыка отвергания банана в условиях действия метитетепина или МК-801 приводила к нарушению воспроизведения навыка, однако при повторном обучении навык быстро формировался.

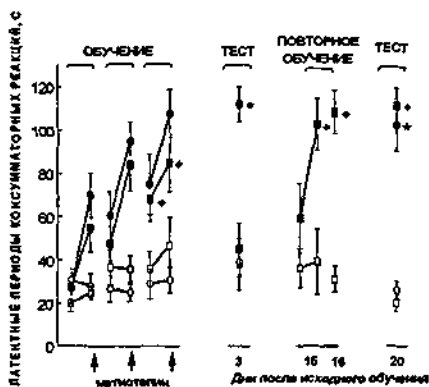


Рис. 8 Влияние антагониста рецепторов серотонина метитетепина на ассоциативное обучение отвергания определенного вида пищи. Обозначения как на рис. 1,7.

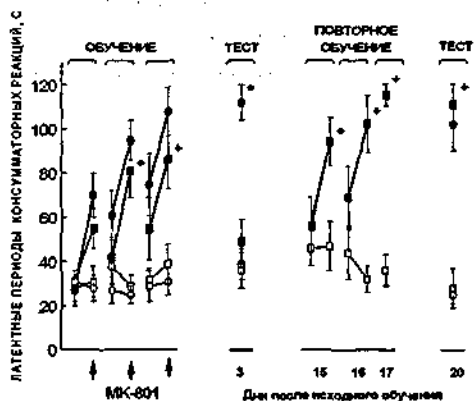


Рис. 9 Влияние антагониста рецепторов NMDA глутамата МК-801 на ассоциативное обучение отвергания определенного вида пищи. Обозначения как на рис. 1,7.

4. Особенности участия обстановочной памяти в механизмах воспроизведения и реконсолидации авersiveного условного рефлекса на пищу.

В зависимости от модели обучения, стимулами инициирующими процессы реконсолидации памяти могут быть как условные раздражители (Nader K., 2000; Tronel S., et al., 2002; Runyan J.D., et al., 2005), так и обстановка обучения (Debiec J., et al., 2002; Lattal K., et al., 2004). Мы исследовали участие обстановочной памяти в процессах воспроизведения и реконсолидации навыка отвергания определенного вида пищи у улитки.

Через 24 ч после 3-х дневного обучения отверганию банана при помещении улиток в обстановку обучения (на пластиковые шары) латентные периоды консуматорных реакций на предъявление банана составляли 115 ± 5 с; они значительно превышали таковые на предъявление дифференцировочного стимула - вареной моркови – 43 ± 11 с ($p < 0,0001$) (рис.10). При перемещении обученных животных в «нейтральную» обстановку - на стеклянную пластину – латентные периоды реакций на банан уменьшались до уровня ответов на вареную морковь ($p > 0,05$). Таким образом, воспроизведение условного рефлекса на пищу у обученных улиток возможно только в обстановке обучения.

Также нами обнаружено, что инъекции улиткам ингибиторов синтеза белка с последующим помещением их в обстановку обучения на 1 ч и предъявлением 3-х условных стимулов приводит к нарушению авersiveного навыка на пищу. Применение этой же экспериментальной парадигмы, но

при уменьшении времени пребывания животных в обстановке обучения до 30 мин или пребывание улиток в обстановке обучения в течение 1 ч без предъявления условных стимулов (напоминание контекстом) не приводило к нарушению навыка.

Таким образом, для индукции процессов воспроизведения необходимо совместное действие условного стимула и обстановки обучения в течение не менее 1 ч. При изолированном действии обстановки обучения память не реактивируется.

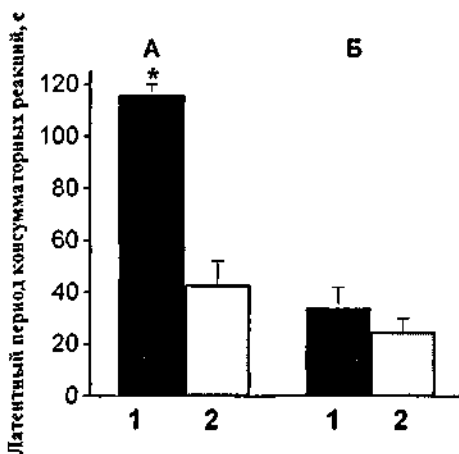


Рис. 10 Воспроизведение авersiveного условного рефлекса на пищу у виноградных улиток в различной обстановке.

А – реакции на пищевые стимулы у улиток, помещенных на пластиковые шары (обстановка обучения). Б – пищевые реакции на стеклянной пластине (нейтральная обстановка). 1 – ответы на предъявления условного стимула (банана). 2 – реакции на дифференцировочный стимул (вареная морковь). По оси ординат – латентные периоды начала поедания пищи, в секундах. * - $p < 0,001$, по отношению к латентным периодам ответов на дифференцировочный стимул.

5. Обратимая и необратимая стадии развития амнезии после нарушения реконсолидации ассоциативной памяти. Существуют отдельные факты позволяющие предположить, что утрата памяти после индукции амнезии является не одномоментным, а развивающимся во времени процессом, зависимым от вида применяемых воздействий и форм обучения (Quartermain D., et al., 1972; Andry D.K., et al., 1972; Gold P.E., 2006). Мы обнаружили, что в течение нескольких дней после нарушения реконсолидации памяти число отказов от условного стимула градуально уменьшалось. В последующих экспериментах, используя процедуру повторного обучения, мы исследовали возможность восстановления авersiveного навыка на пищу через различные сроки после нарушения реконсолидации памяти действием МК-801/напоминанием.

5.1 Через 24 ч после МК-801/напоминания латентные периоды consummatory реакций на первое предъявление банана не отличались достоверно от таковых на дифференцировочный стимул ($n=12$) (27 ± 5 с и 18 ± 4 с соответственно, $p > 0,05$). При последующем повторном обучении латентные периоды реакций на условный стимул увеличивались до 100 с после $1,9 \pm 0,5$ сочетанных раздражений пищи и электротока (против $8,9 \pm 1,1$ при первоначальном обучении) (рис.11). При тестировании сохранности навыка через 15 дней после действия МК-801/напоминания было

выявлено, что латентные периоды консуматорных реакций на условный стимул не отличались у экспериментальных ($n=12$) и контрольных ($n=8$) улиток, получавших инъекции МК-801 без последующей процедуры напоминания (114 ± 6 с и 109 ± 8 с соответственно; $p > 0,05$) и были больше, чем латентные периоды реакций на предъявление дифференцировочного стимула (22 ± 6 с; $p = 0,00003$). Таким образом, повторная выработка навыка отвергания банана через 24 ч после действия МК-801/напоминания приводила к быстрому восстановлению условного рефлекса. При этом количество сочетанных условных и подкрепляющих раздражений было в 4,7 раза меньшим, чем при исходном обучении.

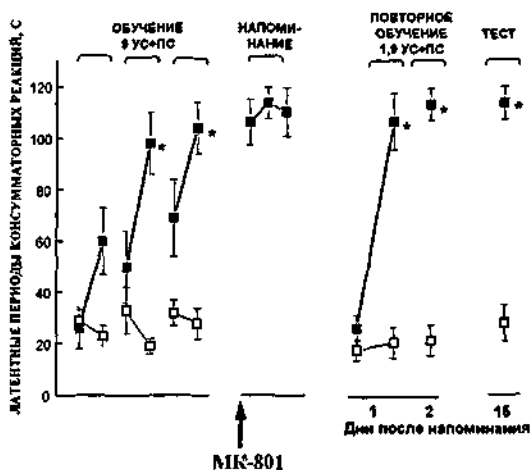


Рис. 11 Повторное обучение отверганию условного пищевого стимула через 24 ч после действия МК-801/напоминания. В верхней части рисунка — схема эксперимента. Темные и светлые квадраты — ответы улиток на предъявление условного и дифференцировочного стимулов соответственно. По оси ординат — латентные периоды консуматорных реакций на предъявление пищевых стимулов, в сек. По оси абсцисс: стрелка — момент инъекции МК-801; цифры под графиками — дни после действия МК-801/напоминания. * - $p < 0,05$ (по отношению к дифференцировочному стимулу).

5.2 При повторном обучении улиток через 3 дня после действия МК-801/напоминания обнаружено (рис. 12), что латентные периоды консуматорных реакций на первое предъявление условного и дифференцировочного стимулов не отличались и составляли 31 ± 9 с и 23 ± 4 с, соответственно ($n=15$) ($p > 0,05$). На 3-й день повторного обучения латентные периоды достигали более 100 с, при этом количество сочетанных предъявлений пищи и электротока было меньшим, чем при первоначальном обучении ($5,1 \pm 0,5$ и $8,9 \pm 0,6$ соответственно; $p < 0,003$). Тестирование выявило, что через 15 дней значения латентных периодов консуматорных реакций на условный стимул не отличались у экспериментальных и контрольных улиток (99 ± 11 с и 109 ± 8 с соответственно; $p > 0,05$) и были существенно больше, чем латентные периоды ответов на дифференцировочный стимул (23 ± 3 с; $p < 0,0002$). Таким образом, повторное обучение через 3 дня после действия МК-801/напоминания приводило к восстановлению авersive пищевого навыка, при этом количество сочетанных условных и подкрепляющих раздражений было в 1,7 раза меньшим, чем при исходном обучении.

5.3 При повторном обучении улиток через 10 дней после действия МК-801 и напоминания латентные периоды консуматорных реакций на первое предъявление условного и дифференцировочного стимулов достоверно не отличались и составляли соответственно $29+7$ с и $21+3$ с; ($n=8$) ($p>0,05$) (рис.13). Повторное обучение животных не приводило к формированию навыка. Через 3 дня после повторного обучения латентные периоды консуматорных реакций на условный стимул у экспериментальных улиток были меньше, чем у контрольных животных ($51+15$ с и $109+8$ с, соответственно; $p<0,0003$) и не отличались от латентных периодов ответов на дифференцировочный стимул ($31+7$ с; $p>0,05$). Кроме того, улитки получали больше сочетанных раздражений пищи и электротока, чем при первоначальном обучении ($11+0,7$ и $8,4+0,5$, соответственно; $p<0,002$). Таким образом, повторное обучение через 10 дней после действия МК-801/напоминания не приводило к выработке авersive пищевого навыка, при этом улиткам предъявлялось в 1,3 раза большее количество сочетаний условных и подкрепляющих раздражений, чем при исходном обучении.

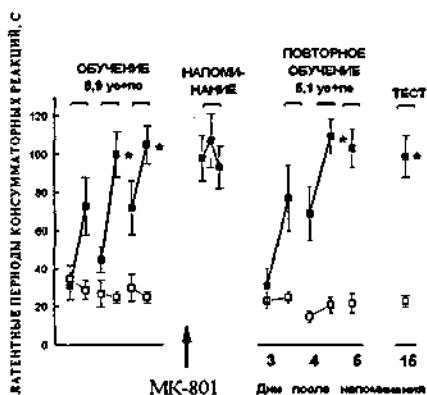


Рис. 12 Повторное обучение через 3 дня после действия МК-801/напоминания. Обозначения как на рис.11.

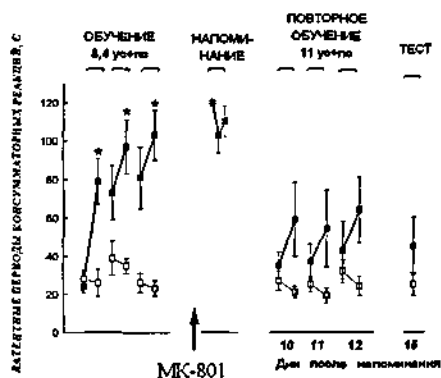


Рис. 13 Повторное обучение через 10 дней после действия МК-801/напоминания. Обозначения как на рис. 11.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Открытие процессов реконсолидации имеет неосценное значение для разработки одной из важнейших проблем нейробиологии – изучения механизмов хранения и воспроизведения долговременной памяти. В экспериментальных исследованиях, проведенных на животных, стоящих на разных ступенях эволюционного развития выявлены некоторые ключевые механизмы реконсолидации памяти, а также развивающейся при ее нарушении амнезии (Dudai Y., 2004; Nader K., Wang S., 2006; Sara S.J., Hars B., 2006; Tronson C., Taylor R., 2007). Вместе с тем, очевидно, что целый ряд принципиальных проблем нейробиологии обучения требуют дальнейших исследований.

В дискуссиях, касающихся проблем реконсолидации памяти, многие авторы (Nader K., 2007; Tronson S., Taylor R., 2007) указывают на то, что до сих пор остается не решенным кардинальный вопрос – является ли экспериментальная амнезия, развивающаяся при нарушении механизмов консолидации и реконсолидации следствием подавления процессов воспроизведения или «стирания следа» памяти?

Очевидно, что для решения этой проблемы необходимо изучение особенностей молекулярных событий, вовлекаемых в развитие экспериментальной амнезии. Эти особенности могут быть вскрыты, в частности, путем использования разных доз ингибиторов синтеза белка, а так же однократных или повторных их инъекций, вызывающих различное по выраженности и продолжительности подавление процессов трансляции (Davis H.P., Squire L.R., 1984).

Исходя из изложенного, мы изучили влияние ингибиторов синтеза белка на механизмы реконсолидации долговременной памяти ассоциативного навыка отвергания определенного вида пищи у виноградной улитки, используя различные варианты предъявления «напоминающих» стимулов и разные дозы ингибиторов синтеза белка.

Нами обнаружено, что у обученных улиток контрольных групп при сочетании действия физраствора и напоминания, а также инъекции ингибиторов синтеза белка в отсутствие напоминающих стимулов навык сохранялся не менее 2-х месяцев. Однократное введение относительно низких доз ингибиторов (циклогексимида в дозе 30 мг/кг или анизомицина в дозе 20 мг/кг) перед напоминанием приводило к транзитному амнестическому эффекту, сохранявшемуся в течение 2-3 ч, с последующим самопроизвольным восстановлением условного рефлекса. При однократной инъекции в высокой дозе циклогексимида (100 мг/кг) или анизомицина (60 мг/кг) перед процедурой напоминания либо трех инъекциях через каждые 2 ч циклогексимида в дозе 30 мг/кг сочетанных с трехкратными предъявлениями напоминающих стимулов амнезия сохранялась более 60 дней. Важно отметить, что повторное обучение животных через 2-4 недели после индукции амнезии не приводило к формированию навыка.

Следует подчеркнуть, что молекулярно-клеточные изменения, лежащие в основе амнезии системноспецифичны – т.е. характерны лишь для нервных клеток и синаптических связей, вовлеченных в систему конкретного поведенческого акта. Нами было показано, что улитки, демонстрировавшие необратимую амнезию после нарушения реконсолидации памяти на определенный вид пищи, обучались ассоциативному навыку отвергания другого вида пищи.

Таким образом, особенности развития амнезии у улиток критически зависят от степени выраженности и/или длительности подавления процессов трансляции. По аналогии с механизмами консолидации долговременной памяти можно предположить, что процесс реконсолидации памяти включает две стадии синтеза белка (Anokhin K.V., Tjunova A.A., 2002; Nader K. 2003; Dudai Y., Eisenberg M. 2004). Транзитная амнезия может быть обусловлена модуляцией синтеза быстро обменивающихся белковых молекул, например, белков ранних генов, период жизни которых

сопоставим с продолжительностью наблюдаемых физиологических эффектов (Anokhin K.V., Tiunova A.A., 2002; Igaz L.M., Vianna M.R.M., 2002; Summer M.J., Crowe S.F., 2003). Индукция долговременной необратимой амнезии, выявленная в наших опытах, может быть связана с изменениями синтеза белков с большой продолжительностью жизни, являющихся продуктами транскрипции «поздних» генов (Igaz L.M., Vianna M.R.M., 2002; Anokhin K.V., Tiunova A.A., 2002; Inda M.C., Delgado-García J.M., 2005).

Активация синтеза белка при предъявлении условного стимула в процессе напоминания должна включать в качестве необходимого этапа стимуляцию определенных нейромедиаторных рецепторов. Имеющиеся данные указывают на то, что механизмы вовлечения различных нейромедиаторных систем в процессы формирования памяти характеризуются определенными особенностями и, в частности, в отношении кодирования и трансляции сенсорной информации, консолидации и стабилизации памяти, а так же механизмов модуляции этих процессов (Кругликов Р.И., 1986; McGaugh J.L., 2000; Базян А.С., Григорян Г.А., 2006; Robbins T.W., Murphy E.R., 2006). Однако специфичность участия различных нейромедиаторов в механизмах реконсолидации следа памяти остается практически не исследованной проблемой.

Мы изучили особенности механизмов участия рецепторов серотонина и рецепторов NMDA глутамата в процессах реконсолидации ассоциативного аверсивного навыка на пищу у улиток. У улиток, которым через 24 ч после обучения инъектировали неселективный антагонист рецепторов серотонина метитетепин или антагонисты NMDA рецепторов глутамата (МК-801 или APV) с последующей процедурой напоминания, обнаружено подавление воспроизведения условнорефлекторного навыка. У улиток демонстрировавших амнезию после действия метитетепина/напоминания обнаружен эффект облегчения повторного обучения, проводимого через 2 недели после индукции амнезии. В то же время при нарушении воспроизведения после воздействия МК-801/напоминания или APV/напоминания повторное обучение не приводило к формированию навыка.

Полученные результаты позволяют предположить, что NMDA-зависимые молекулярные механизмы вовлечены в процессы хранения «памятного следа». Действие антагонистов рецепторов NMDA приводит не только к нарушению реконсолидации памяти, но и к невозможности последующей повторной консолидации навыка. Рецепторы серотонина, по-видимому, участвуют в механизмах извлечения «памятного следа», но не вовлекаются в процессы его хранения, либо механизмы амнезии зависят как от нарушения процессов воспроизведения, так и частичного повреждения «памятного следа», которое устраняется при повторном обучении.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что при одной и той же форме обучения могут развиваться разные виды амнезий – обратимая и необратимая, в основе которых могут лежать различные нейрофизиологические и молекулярные механизмы. Развитие того или иного вида амнезии зависит от механизмов действия агентов, примененных для индукции

экспериментальной амнезии, особенностей парадигмы обучения и процедуры напоминания, «силы» обучения, «возраста» памяти, и др.

Важным аспектом обсуждаемой проблемы является вопрос об идентичности процессов первоначальной консолидации и реконсолидации памяти. В ряде исследований обнаружено как сходство ключевых молекулярных событий, вовлекаемых в эти процессы, так и их различие (Alberini C.M., et al., 2006; Tronson C., Taylor R., 2007). Нами обнаружено, что как при обучении, так и реконсолидации памяти действие ингибиторов синтеза белка вызывало развитие необратимой амнезии, а инъекции антагонистов рецепторов серотонина индуцировали амнезию, легко обратимую повторным обучением. Вместе с тем, выявлены существенные различия роли рецепторов NMDA глутамата в этих процессах. Выработка ассоциативного навыка отвергания пищи в условиях действия антагонистов рецепторов NMDA приводила к амнезии, сохранявшейся не менее 2-х недель. Однако, при последующем повторном обучении навык быстро восстанавливался. Реконсолидация памяти во время действия этих антагонистов так же приводила к развитию амнезии, но в этом случае формирования навыка при последующем повторном обучении улиток не происходило. Следует отметить, что выявленные особенности участия рецепторов NMDA в указанных процессах могут быть не столь принципиальны, если учитывать различия экспериментальных парадигм, применяемых при консолидации и реконсолидации памяти. В частности, использовавшийся при исходном обучении подкрепляющий стимул за счет его выраженного биологического эффекта мог активировать процессы, которые частично компенсировали функции ингибированных NMDA рецепторов и, тем самым, препятствовали развитию необратимой амнезии. С другой стороны, при реконсолидации памяти подкрепляющий стимул не применялся, в связи с чем компенсаторные возможности преодоления последствий ингибирования рецепторов NMDA, по-видимому, не активировались и развивалась необратимая амнезия.

Существуют отдельные факты позволяющие предположить, что утрата памяти после индукции амнезии является не одномоментным, а развивающимся во времени процессом, зависимым от вида применяемых воздействий и форм обучения (Quartermain D., McEwen B.S., 1970; Squire L.R., Barondes S.H., 1972; Gold P.E., 2006). Следует, однако, отметить, что систематического изучения динамики и особенностей развития амнезии не проводилось, не изучены клеточные и молекулярные механизмы ее индукции и сохранения. Нами выявлено, что после нарушения реконсолидации памяти отвергания определенного вида пищи антагонистом рецепторов NMDA глутамата МК-801 развивалась амнезия, включающая две стадии. Первая стадия продолжалась менее 10 дней и характеризовалась градуальным уменьшением числа отказов от условного пищевого стимула и возможностью восстановления памяти при повторном обучении отвергания того же вида пищи, что и при первоначальном обучении. Следует отметить, что возможность восстановления памяти снижалась постепенно с увеличением времени от момента

индукции амнезии. Так, для восстановления навыка через 1 сутки после его нарушения требовалось всего 1,9 предъявления сочетанных раздражений банана и электрического тока, тогда как через 3 суток требовалось 5,1 сочетанных раздражений (при первоначальном обучении – 7-8). Вторая стадия амнезии характеризовалась утратой способности животных к восстановлению памяти при повторном обучении. В частности, при выработке навыка отвергания пищи через 10 дней после индукции амнезии обнаружено нарушение формирования условного рефлекса, несмотря на то, что количество сочетанных раздражений пищи и электрического тока в 1,3 раза превышало таковое при исходном обучении.

Каковы возможные механизмы градуального развития амнезии, возникающей после нарушения реконсолидации долговременной памяти? Согласно мнению ряда авторов (Nader K., 2007; Tronson C., Taylor R., 2007) развитие амнезии связано с «реверсией» морфофункциональных изменений, сформированных в процессе обучения. Исходя из наших экспериментальных результатов, можно предположить, что эти изменения нарастают с увеличением времени от момента нарушения памяти, однако в первые несколько дней морфологические перестройки и амнезия сравнительно легко обратимы процедурой повторного обучения. Вместе с тем, было бы неверным утверждать, что процессы амнезии и формирования памяти идентичны и отличаются лишь обратной последовательностью развития. Более того, процессы амнезии, по-видимому, существенно отличаются от механизмов формирования памяти. Об этом свидетельствует тот факт, что после окончания процесса «деконсолидации» следовало бы ожидать «стирания» следа памяти, что не исключает возможности формирования того же вида навыка при повторном обучении. Однако к 10-му дню деструктивные изменения, по-видимому, завершаются формированием качественно нового морфо-функционального состояния первых клеток, которое характеризуется нарушением механизмов консолидации этого навыка при повторном обучении.

В настоящее время сложно определить, следствием каких процессов является необратимая амнезия. Одной из ее причин может быть «разрушение» морфологических «носителей» эпиграммы вследствие гибели нейронов или элиминации функционально необходимых синаптических связей между нервными клетками. Другая причина нарушения консолидации памяти при повторном обучении – нарушение молекулярных процессов долговременной синаптической пластичности у нейронов, вовлеченных в процессы формирования и сохранения эпиграммы. Возможными механизмами стабильной амнезии в этом случае могут быть: устойчивая репрессия транскрипции генов, эпигенетические механизмы, подобные модификации хроматина при метилировании ДНК, прионоподобные автопреобразования и другие молекулярные события, вовлеченные в долговременную регуляцию синаптической пластичности (Miller C.A., Swcatt J. D., 2006; Routtenberg A., 2008; Kandel E.R., 2010).

Полагают, что ведущую роль в извлечении прошлого опыта из памяти играют доминирующая мотивация, обстановка (контекстуальная) и пусковая (условная, сигнальная) афферентация

(Анохин П.К., 1974). В зависимости от модели обучения, стимулами инициирующими процессы реконсолидации памяти могут быть как условные раздражители так и обстановка обучения (Debiec J., LeDoux J.E., 2002; Lattal K. M., Abel T., 2004; Runyan J.D., Dash P.K., 2005; Муравьева Е.В., Анохин К.В., 2006). Нами обнаружено, что условная реакция на предъявление пищи возможна только в обстановке обучения и не проявлялась в нейтральном контексте. Кроме того, выявлено, что для индукции процессов реконсолидации долговременной памяти у улиток необходима интеграция возбуждений, вызываемых условным стимулом и обстановочной афферентацией. При изолированном действии обстановки обучения память не реактивируется. Можно предположить, что в механизмах индукции процессов реконсолидации в использованной нами модели обучения «доминируют» механизмы, лежащие в основе памяти об условном стимуле, так как аверсивная память на пищу реактивировалась при напоминании условным стимулом в обстановке обучения, но не обстановкой обучения в отсутствие условных стимулов.

Таким образом, в наших экспериментальных исследованиях получены новые данные, вносящие существенный вклад в решение ряда теоретических вопросов проблемы хранения памяти и процессов амнезии, также имеющие определенное практическое значение. Особо следует отметить, выявленные различные стадии развития амнезии, которые, возможно, являются общебиологическим феноменом, характерным, по крайней мере, для некоторых форм памяти у разных видов животных, а не только для использованной нами модели обучения. Наличие стадий чувствительности амнезии к модулирующим воздействиям требует учитывать этот факт при тестировании сохранности памяти и возможности ее восстановления на разных сроках после индукции амнезии. Полученные нами результаты можно использовать при клиническом анализе процессов амнезии, возникающей, в частности, при «острой» потере памяти различного генеза. Тактика коррекции нарушенной памяти терапевтическими процедурами или фармакологическими препаратами может иметь существенные особенности в зависимости от стадий амнезии, вовлекающих различные молекулярные и клеточные механизмы.

ВЫВОДЫ

1. Действие ингибиторов синтеза белка во время обучения отвергания определенного вида пищи у улиток приводило к развитию амнезии, которая была необратима при повторной выработке навыка, тогда как обучение во время действия антагонистов рецепторов NMDA глутамата или рецепторов серотонина вызывало амнезию, обратимую повторным обучением.
2. Действие антагонистов рецепторов NMDA глутамата во время реконсолидации навыка отвергания определенного вида пищи приводило к развитию амнезии, включавшей две стадии: на ранней стадии (<10 дней) навык восстанавливался при повторном обучении, тогда как на поздней стадии амнезии (≥10 дней) повторное обучение не приводило к восстановлению навыка.
3. При реконсолидации аверсивного навыка на пищу во время действия ингибиторов синтеза белка в относительно высоких дозах возникала амнезия, которая была необратима при

повторном обучении; реконсолидация памяти и использование относительно низких доз ингибиторов синтеза белка приводили к транзиторному нарушению навыка.

4. Действие антагониста рецепторов серотонина во время реконсолидации навыка отвергания определенного вида пищи характеризовалось возможностью восстановления памяти при повторном обучении.

5. Предъявление условного стимула в «нейтральной» обстановке, а также помещение улиток в обстановку обучения без последующего предъявления условных стимулов не приводило к реактивации ассоциативной памяти на пищевой раздражитель.

6. Механизмы реконсолидации и развития амнезии специфичны для определенного вида памяти. У улиток, обученных отвергать два вида пищи, амнезия развивалась только на ту пищу, реактивация памяти на которую была нарушена. У животных, демонстрировавших устойчивую амнезию на определенный вид пищи, вырабатывался навык отвергания «нового» вида пищи.

Основные публикации, в которых отражено содержание диссертации

1. Солнцева С.В., Никитин В.П., Козырев С.А., Шевелкин А.В., Лагутин А.В., Шерстнев В.В. Ингибирование синтеза белка во время реактивации ассоциативной памяти у виноградной улитки вызывает транзиторную или необратимую амнезию. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2006. 92. (9): 1058-1068.

2. Солнцева С.В., Никитин В.П. Антагонисты рецепторов серотонина и NMDA глутамата избирательно нарушают реактивацию ассоциативной памяти у виноградной улитки. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2007. 93. (10): 1101-1111.

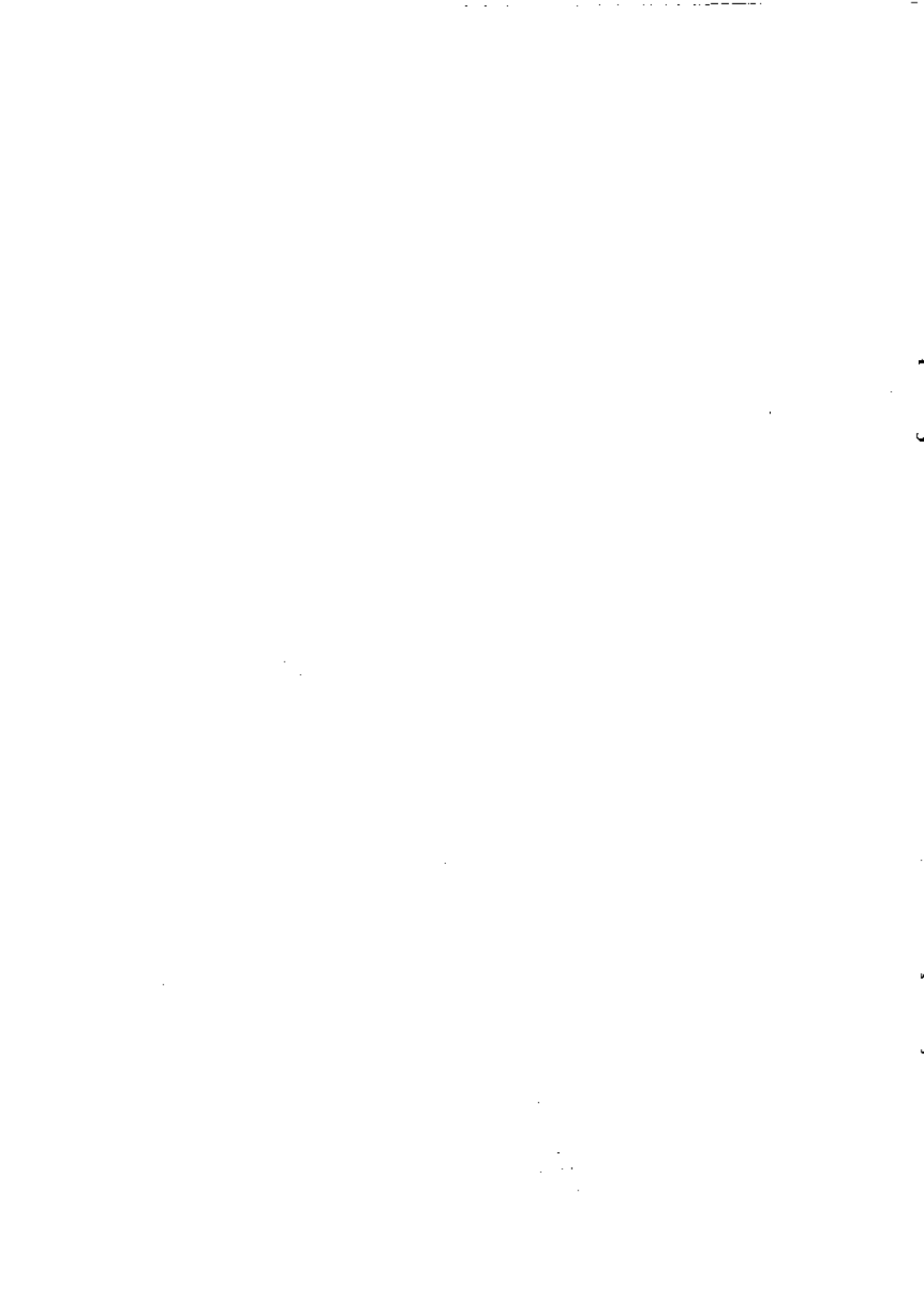
3. Саушкина А.А., Солнцева С.В., Комарьков И.Ф., Никитин В.П., Шерстнев В.В. Различные механизмы вовлечения обстановочной памяти в процессы воспроизведения ассоциативного навыка у виноградной улитки. Нейрохимия. 2007. 24. (4): 312-317.

4. Солнцева С.В., Никитин В.П. Нейромедиаторные и зависимые от синтеза белка механизмы консолидации ассоциативного авersiveго обучения на пищу у виноградной улитки. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2008. 94. (8): 860-870.

5. Солнцева С.В., Никитин В.П. Обратимая и необратимая стадии развития амнезии после нарушения реактивации ассоциативной памяти у улитки. ЖВНД. 2009. 59(3):344-352.

6. Солнцева С.В., Никитин В.П. Эффекты агонистов NMDA рецепторов глутамата и серотонина на разных стадиях амнезии, вызванной нарушением реконсолидации долговременной памяти. Нейрохимия. 2010. Т.27. №3. с.1-7.

7. Солнцева С.В., Никитин В.П. Синтез белков необходим для индукции амнезии, возникающей при нарушении реактивации долговременной памяти. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2010. 96. №3. с.301-312.



Подписано в печать: 22.09.10
Объем: 1,5 усл.л.
Тираж: 100 экз. Заказ № 7698546
Отпечатано в типографии «Реглет»
119526, г.Москва, пр-т Вернадского,39
(495) 363-78-90; www.reglet.ru

2011A

2523

2-2523