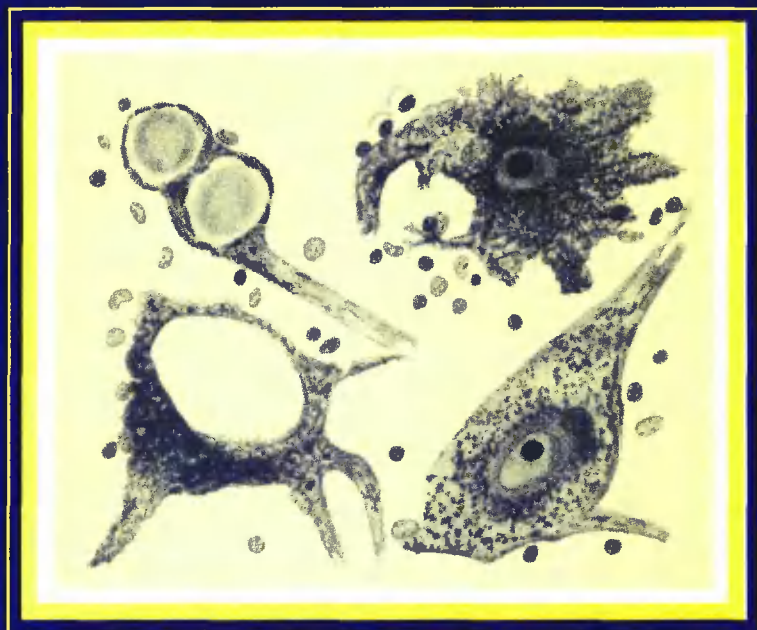


Л. И. Корочкин
А. Т. Михайлов

Введение в НЕЙРОГЕНЕТИКУ



«НАУКА»

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА

Л. И. Корочкин

А. Т. Михайлов

Введение в НЕЙРОГЕНЕТИКУ



Москва
«НАУКА»
2000

УДК 575
ББК 52.5
К 66

Ответственный редактор
член-корреспондент РАН *Г.П. Георгиев*

Рецензенты:
академик РАЕН *С.М. Закиян*,
доктор биологических наук *И.И. Полетаева*

Корочкин Л.И., Михайлов А.Т.

Введение в нейрогенетику. – М.: Наука, 2000. – 274 с., ил.
ISBN 5-02-004304-5.

Книга посвящена актуальным проблемам современной нейрогенетики. Авторы рассматривают нейронную теорию как основу нейробиологии и нейрогенетики и на базе этой теории дают подробный анализ различных аспектов этих наук. Подробно описаны генетические системы, которые определяют выбор клеткой пути развития и характер дифференцировки нейронов. Рассмотрены различные экспериментальные модели, используемые в нейрогенетике и генетике поведения, и теории, которые появились в ходе анализа результатов, полученных при исследовании этих моделей.

Для специалистов разных областей биологии и генетики, аспирантов и студентов, занимающихся нейробиологией и нейрогенетикой.

ТП 2000–I–№ 181

Korochkin L. I., Mikhailov A. T.

Introduction in neurogenetics. – М.: Nauka, 2000. – 274 p., Il.
ISBN 5-02-004304-5

This book is devoted to the actual problems of the modern neurogenetics. The authors analysed the neurone's theory as a basis of the modern neurobiology and neurogenetics. The genetic systems, which determine a pattern of the nerve cells differentiation, are described. Some experimental models of behavioral genetics and the results of its investigations are analysed.

This book is good illustrated and interesting for many scientists, students and postgraduate students, who study neurobiological and neurogenetical problems.

ISBN 5-02-004304-5

© Издательство "Наука", 2000

ПРЕДИСЛОВИЕ

В предыдущей монографии “Введение в генетику развития” рассмотрены некоторые общие принципы генетической и молекулярно-генетической регуляции индивидуального развития (единство процессов активации и ингибирования, кластерирования генов, принцип коллинеарности, единство целого при автономии частей и др.). Настоящая книга является продолжением предыдущей, в ней мы стремились продемонстрировать, как эти общий принципы “работают” при становлении такой важнейшей системы, как нервная система, обеспечивающая интегративное, гармоничное исполнение функций целостным организмом.

Основная идея, которая проводится авторами, заключается в том, что генетически детерминированные особенности различных поведенческих реакций и функциональных актов нервной системы закладываются, “преформируются” в ходе ее онтогенетического развития. Можно предложить аналогию с процессом свертывания крови: оно является генетически детерминированным в том смысле, что все его компоненты закодированы в геноме и синтезируются под контролем соответствующих генов. Мутации в каком-либо из них вызывают те или иные нарушения этого процесса (типа, например, гемофилии). Однако после того как все компоненты реакции свертывания крови синтезированы, для осуществления ими их функции уже не требуется транскрипционной активности соответствующих генов – свертывание крови является результатом взаимодействия этих компонентов. И можно себе представить, сколько бед принесла бы организму необходимость предварительной активации генетического аппарата!

Точно так же и в процессе развития нервной системы формируются генетически детерминированные специфические нервные сети. В специфике их организации как бы преформированы особенности поведения, для реализации которых уже не нужна транскрипционная активность каких-то новых нейроспецифических генов. Функция генов необходима лишь для восполнения запасов утрачиваемых в ходе усиленного функционирования белков. При этом возрастает активность уже “работавших” нейрогенов без стимуляции транскрипции каких-либо новых последовательностей ДНК, так что специфика “новообразованного” поведенческого акта обусловлена преформированной в ходе онтогенеза организацией соответствующих нервных сетей, которые участвуют в реализации этого акта. Сама его реализация становится возможной в силу наличия предсуществующих (и дифференцированных в ходе осуществления генетической программы развития), но не функционировавших до поры до времени синаптических контактов, которые замы-

каются (“прорываются”) в момент образования нового нейрофункционального акта (например, условного рефлекса). Предполагается, таким образом, что генетическая детерминированность нейроспецифических функций достигается благодаря функционированию нейрогенов, контролирующих онтогенетическое развитие нервной системы. Их мутации ведут к нарушению развития соответствующих отделов головного мозга (или соответствующих типов нервных клеток) и к аномалиям тех форм поведения, осуществление которых зависит от этих отделов мозга (или от “пострадавших” специфических типов нервных клеток). В ходе нейроонтогенеза большая роль отводится морфогенетическим процессам, связанным с взаимодействием различных морфофункциональных регионов мозга (модулей), так что набор генов, детерминирующих формирование одного такого модуля, может быть значимым для морфогенеза другого модуля, отвечающего на подрастания аксонов от первого определенной специфической морфогенетической реакцией, которая не зависит от набора функционально активных собственных генов.

Мы сознательно не рассматривали некоторые аспекты генетики поведения, особенно связанные со специфическими методами этого раздела нейрогенетики, с этологическими проблемами и с проблемами коммуникации, поскольку эти аспекты детально изложены в книге З.А. Зориной, И.И. Полетаевой и Ж.И. Резниковой “Основы этологии и генетики поведения” (М.: Изд-во МГУ, 1999). Эту книгу можно считать продолжением нашего “Введения в нейрогенетику”. Думаем, что, ознакомившись с этими двумя монографиями специалисты, а также студенты и аспиранты получают, в общем, достаточно полное представление о современном состоянии нейрогенетики и генетики поведения и перспективах их дальнейшего развития.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НЕЙРОГЕНЕТИКИ

ВВЕДЕНИЕ

Нейрогенетика – сравнительно молодая наука, и, в сущности, ее развитие только-только начинается, хотя уже получено немало интересных результатов.

Что же это такое, нейрогенетика? Это дисциплина, развившаяся на стыке генетики, нейробиологии и биологии развития. Современная нейрогенетика обращает особое внимание на формирование нервных сетей в онтогенезе и при этом широко использует молекулярно-биологические методы, а также весь арсенал биохимических, физиологических и морфологических методов.

Нейрогенетика, следовательно, изучает морфогенетические, молекулярные и физиологические механизмы развития и функционирования нервной системы. При этом исследуются самые разнообразные объекты – млекопитающие, насекомые, моллюски, амфибии и др. Предпочтение, естественно, отдается генетически хорошо изученным объектам, таким, как дрозофила и мышь. В последнее время широко используются также быстро размножающиеся червь *Caenorhabditis* и рыбка Данио (*zebra fish*). Как и во всякой генетической работе, на первом этапе исследований ищут разнообразие по исследуемому признаку (например, по способности обучаться или по толщине коры головного мозга), затем с помощью обычных, принятых в генетике приемов определяют, детерминируются ли это разнообразие генетически. После этого начинают искать соответствующие гены и локализовывать их. Молекулярно-биологическая техника позволяет выделять эти гены и выявлять последовательность нуклеотидов, их составляющих (секвенирование), на основании чего можно “сконструировать” аминокислотную последовательность белка, кодируемого данным конкретным геном, и анализировать его возможное функциональное значение.

Большой интерес вызывает связь молекулярно-генетических событий, происходящих в дифференцирующихся нервных клетках в ходе индивидуального развития, с генезом их морфологических и функциональных свойств. Длительный период не было соответствующих подходов, которые позволили бы четко эту связь продемонстрировать. В настоящее время благодаря сочетанию классических генетических и молекулярных методов это удастся сделать, чему будет посвящена специальная глава в нашей книге.

Наконец, одной из центральных проблем молекулярной нейрогенетики являются механизмы обучения и памяти. Сейчас не вызывает сомнений сам факт генетической детерминированности способностей к обучению и запоминанию приобретаемых навыков. Однако когда заходит речь о том, каковы материальные основы этих процессов, возникает множество вопросов, на которые пытаются найти ответы. В связи с этим особый интерес имеют сравнительные аспекты нейрогенетики, исследование одних и тех же процессов у разных животных, характеризующихся определенными особенностями в поведении. Весьма эффективным в этом отношении может оказаться сравнительно-онтогенетический подход, когда степень дифференцированности нервной системы на разных стадиях индивидуального развития разных животных сопоставляется с тем набором поведенческих реакций, которые могут осуществляться в те же периоды онтогенеза.

В нашей книге мы постараемся рассмотреть все эти проблемы, способы их решения, а также пути и перспективы развития современной нейрогенетики.

НЕЙРОННАЯ ТЕОРИЯ – ОСНОВА НЕЙРОГЕНЕТИКИ

В основе нейрогенетики лежит **нейронная теория**, разработанная в деталях великим испанским нейрогистологом Рамон-и-Кахалем. Именно он, а также итальянский гистолог Камилло Гольджи открыли специфические методы исследования, которые позволили анализировать гистологическую структуру нервной системы, за что оба были удостоены Нобелевской премии в 1906 г.

В то время существовало две гипотезы о строении нервной системы – **теория сети и нейронная теория**. Первую в начале века выдвинул Герлах и поддержали Гельд, Мейнерт и Гольджи, а в последующем активно пропагандировали профессор университета в Страсбурге Альфред Бете и немецкий гистолог Штер, вторую предложили в те же годы Гис и Форель.

Согласно теории сети (теория непрерывности, фибриллярная теория) нервная ткань представляет собой своеобразный синцитий, в котором клетки фактически лишены индивидуальности, ибо их отростки непрерывно переходят один в другой, так что формируется непрерывная диффузная нервная сеть (рис. 1.1, *a, b*). Против теории сети выступил в 1886 г. Гис и в 1887 г. Форель, предположившие, что каждая нервная клетка представляет собой морфофункционально самостоятельную единицу и ее отростки заканчиваются свободно, а не сливаются с отростками других клеток (рис. 1.1, *c*). Для обозначения этой автономной единицы немецким ученым Вальдейером еще в 1891 г. был предложен термин “нейрон”, который используется в современной неврологии.

Труды Кахаля и его учеников (Фернандо де Кастро, Лоренте де Но, Ф. Тельо и др.), а также Леношека, Ван Гехухтена, Ретциуса, Келликера, Лэнгли и других доказали справедливость нейронной модели организации нервной сис-

Великий испанский гистолог Рамон-и-Кахаль, лауреат Нобелевской премии, основоположник современной неврологии, создатель нейронной теории. Его труды не только революционизировали учение об организации нервной системы, но и позволили на новой основе преобразовать психиатрию и представления о механизмах нервных болезней.



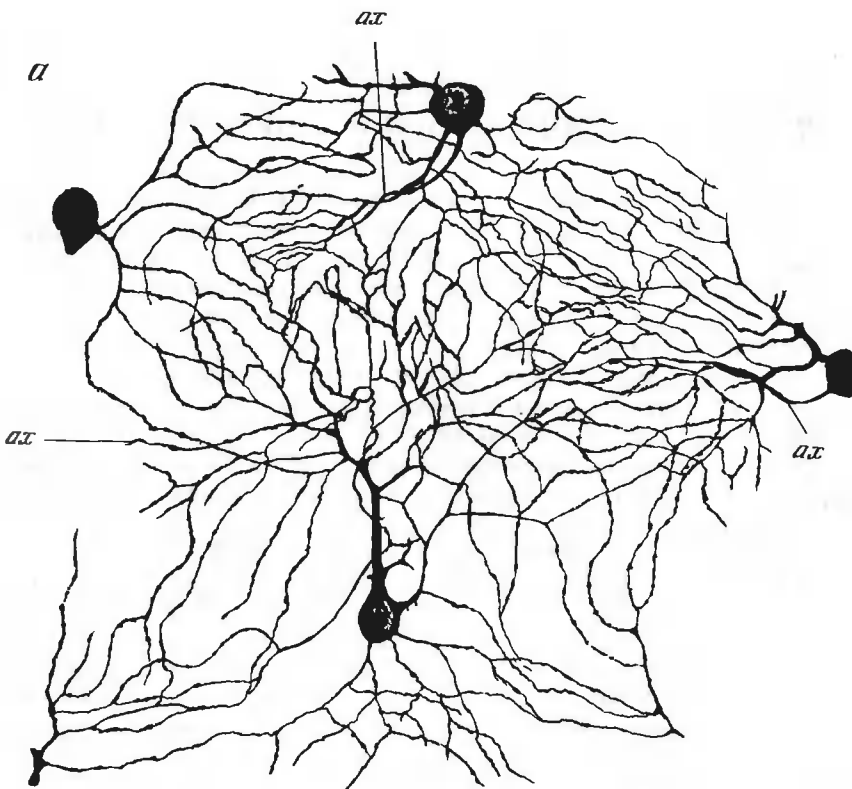
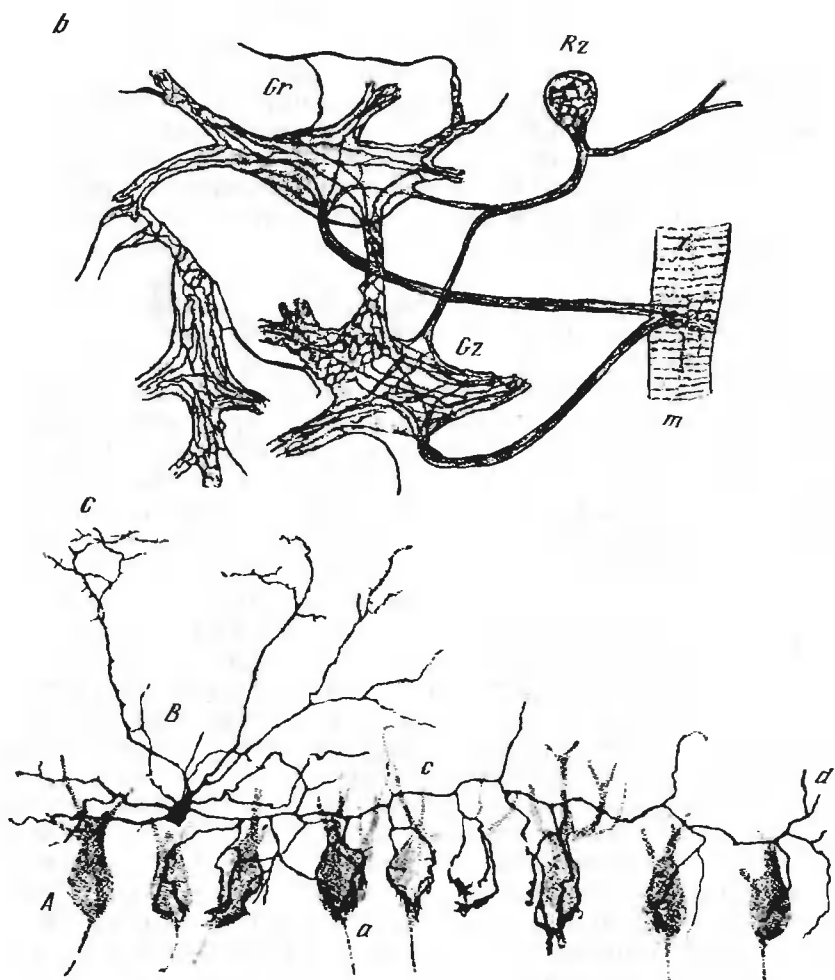


Рис. 1.1. Строение нервной системы по нейронной и ретикулярной гипотезам. *a* – несколько нервных клеток из сетчатки человека, дендриты которых, разветвляясь и соединяясь вместе, образуют нервную сеть (по Догелю). *b* – схема строения нервной ткани согласно ретикулярной гипотезе. *c* – корзинчатые клетки мозжечка (*в*) белой крысы по Рамон-и-Кахалю (*A* – клетки Пуркиньи, *a* – перичеллюлярные разветвления аксона (*c*), *d* – тонкие концевые терминалы аксона)

темы. Они продемонстрировали, что нейроны в процессе индивидуального развития изначально формируются как автономные клетки, лишенные синцитиальных связей друг с другом. Растущие в процессе их дифференцировки отростки не проникают в тела других клеток, но устанавливают с ними контакт, так что индивидуальность каждой клетки сохраняется. Если перерезать какой-нибудь нервный ствол, то в процессе восстановления отчетливо видна сохранность индивидуальных свойств составляющих его нервных волокон, и эта индивидуальность проявляется в регенерации каждого из них. Растущее после перерезки нервное волокно восстанавливает связи с тканью мишенью, включая нейроны, не сливаясь с телом соответствующей иннервируемой клетки. Было также показано, что сетчатое строение нервной системы на препаратах сторонников фибриллярной теории получалось в результате неправильной фиксации и



являлось, таким образом, артефактом. Ленгли с помощью физиологических методов также подтвердил нейронную теорию, показав, в частности, что у кошки все симпатические нейроны, иннервирующие мигательную перепонку, расположены в верхнем шейном узле симпатического нервного ствола. После удаления верхнего шейного узла можно наблюдать все этапы дегенерации постганглионарных волокон и их окончаний в гладкой мускулатуре мигательной перепонки кошки. Дж. Ленгли обнаружил также, что передача нервного импульса от одного нейрона к другому происходит с задержкой в области их контакта, что не должно было бы происходить в случае синцитиального, а не нейронного строения нервной системы.

Появление электронной микроскопии и внедрение ее в неврологию обеспечило полный триумф кахалевских взглядов.

Каковы же основные положения нейронной теории?

1. Вся нервная система, за вычетом вспомогательных нейроглиальных клеток и соединительной ткани, складывается из огромного количества нейронов; только в коре головного мозга человека их насчитывают по крайней мере 14 миллиардов, в головном мозге насекомых содержится 10^4 – 10^5 и более нервных клеток. Каждый нейрон является **клеточной единицей, самостоятельной в гистогенетическом, анатомическом и функциональном отношении**. Помимо нейронов каких-либо других элементов, которым можно было бы приписать нервные функции, не существует.

2. Каждый нейрон у зародыша развивается из **одной** зародышевой клетки, **нейробласта**. Особенностью нейронов является то, что они никогда **не делятся**.

3. Во взрослом организме нейрон может обладать разными размерами и формой, но схематически его всегда легко представить как клетку с отростками (рис. 1.2. а, б). Он состоит, следовательно, из **тела** клетки (перикариона), содержащего ядро, и отростков, которые подразделяются на **дендриты**, по которым к нейронам поступает нервный импульс, и **аксон**, по которому импульс распространяется от нейрона к другим клеткам.

Для большинства нейронов характерно наличие крупного, как правило сферического, ядра с одним или несколькими ядрышками, а также необычное по сравнению с другими клетками организма ядерно-плазматическое отношение, которое колеблется от 0,096 для клеток верхнего шейного симпатического ганглия до 0,41 для клеток ядра Дейтерса.

Аксон всегда один и может быть длинным (до 1 м), коротким, может ветвиться самым причудливым образом. Аксон часто имеет оболочку. Как показано на схеме 1.3, аксон переходит в так называемый осевой цилиндр нервного волокна, и на начальном участке, около тела, является голым и отдает коллатеральные отростки, далее он “одевается” миелиновой оболочкой, формирует дополнительные коллатерали. а затем, выходя из ЦНС и входя в состав какого-нибудь нервного ствола, покрывается миелиновой и так называемой шванновской глиальной оболочкой и превращается в осевой цилиндр периферического нервного волокна с сужениями, которые называются перехватами Ранвье по имени первооткрывателя.

Пройдя определенное расстояние, аксон теряет миелин, сохраняя лишь шванновскую оболочку и превращается в осевой цилиндр ветвящегося волокна. Наконец, он становится опять совершенно голым и распадается на так называемые телодендрии (от греческих слов; telos – конец, dendron – дерево, ветвь), которые оканчиваются на мишенях. Эти окончания еще в 1897 г. по предложению великого физиолога Шеррингтона были названы синапсами (от греч. synapsis – контакт, соединение). Различают возбуждающие синапсы, которые передают импульсы, активирующей нейрон, и тормозящие синапсы, которые передают импульсы, тормозящие его активность.

Количество синапсов у разных нейронов разное. Так, на двигательном нейроне передних рогов спинного мозга содержится несколько сот

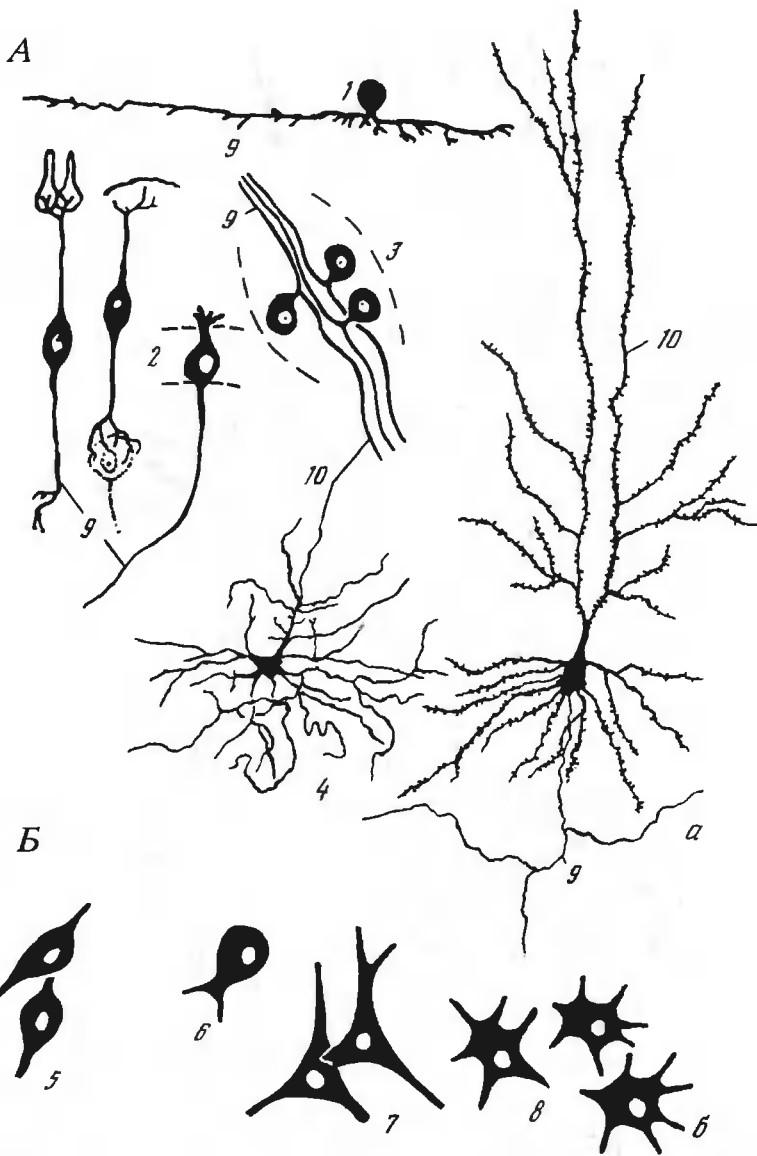


Рис. 1.2. Классификация основных типов нервных клеток по числу отростков (А) и по форме тела (Б).

1–8 – нейроны: 1 – униполярный (амакриновая клетка), 2 – биполярный, 3 – псевдоуниполярный, 4 – мультиполярный, 5 – веретеновидный, 6 – грушевидный, 7 – треугольный, 8 – многоугольный; 9–10 – отростки нейрона: аксон (9) и дендриты (10). По В.П. Бабминдре, 1985.

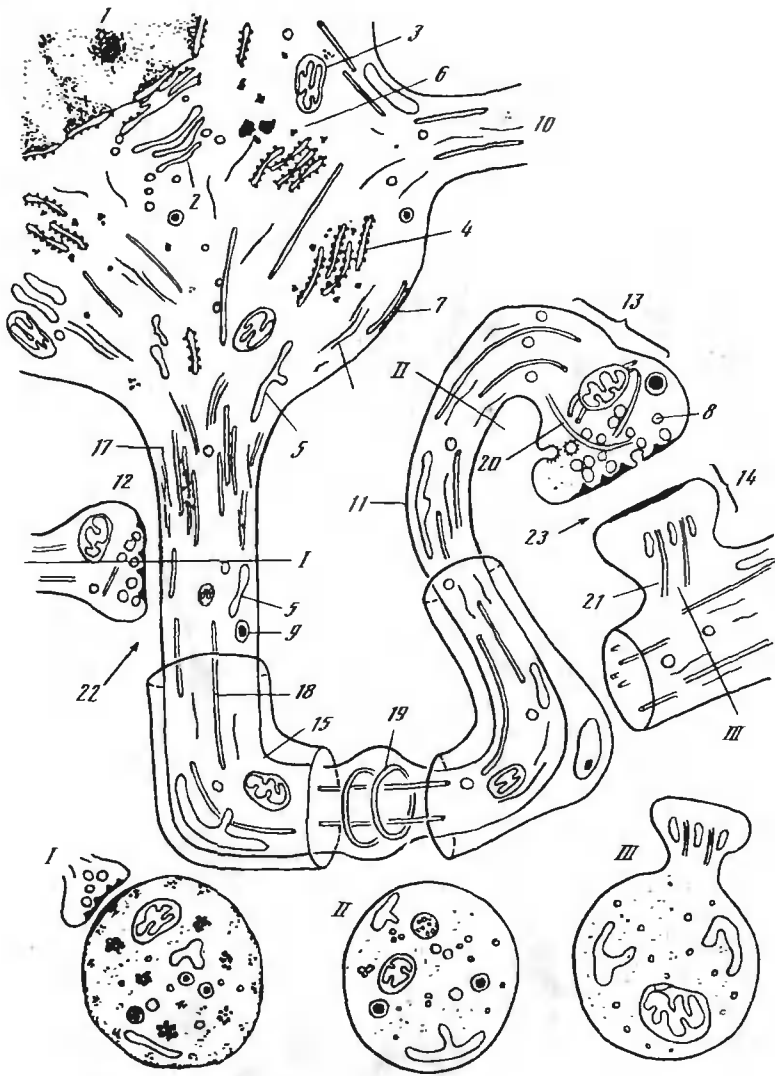


Рис. 1.3. Строение нейрона. По Gray, 1983.

I–III – уровни поперечных срезов отростков и схемы их строения: 1 – ядро, 2 – аппарат Гольджи, 3 – митохондрии, 4 – шероховатый эндоплазматический ретикулум (ЭПР), 5 – гладкий ЭПР, 6 – свободные рибосомы и полисомы, 7 – субповерхностные цистерны, 8 – синаптические пузырьки, 9 – мультивезикулярные тела, 10 – дендрит, 11 – аксон, 12 – аксонный холмик, 13 – аксонное окончание (синапс), 14 – шипик с шипиковым аппаратом, 15 – глиальная оболочка аксона, 16 – нейрофиламенты, 17–21 – различные виды микротрубочек, 22, 23 – аксо-аксонный (22) и аксо-шиповый (23) контакты.

синапсов, распределенных по его телу и дендритам. Некоторые нейроны способны иметь до нескольких десятков тысяч контактных контактов, которые обеспечиваются синаптическими контактами, так что клеточную поверхность нейрона можно рассматривать как приемник разнообразных синапсов. Следовательно, один нейрон может образовывать связи с тысячами других нервных клеток.

Такова светооптическая картина нейрона.

Согласно электронно-микроскопическим данным в ядерной оболочке имеется много пор, через которые происходят активные обменные процессы между ядром и цитоплазмой.

Специфическим компонентом цитоплазмы нейрона является вещество Ниссля, представленное плотно упакованными цистернами гранулярного эндоплазматического ретикулума, в стенках которого расположены рибосомы (рис. 1.3, 4). Между цистернами в узких полосках цитоплазмы располагаются многочисленные свободные рибосомы и цитосомы (рис. 1.3, 6). Вещество Ниссля (тельца Ниссля) является, следовательно, аппаратом для синтеза клеточного белка. Распределение телец Ниссля в теле нейрона специфично для разных видов нервных клеток и образует своеобразный рисунок, особенности которого хорошо выявляются с помощью специальной окраски и видны в светооптический микроскоп (рис. 1.4). Гладкий (агранулярный) эндоплазматический ретикулум (ЭПР) представлен сетью анастомозирующих уплощенных цистерн и трубочек различного диаметра (рис. 1.3, 5). Эта сеть является частью системы внутриклеточного транспорта веществ.

Аппарат Гольджи (АГ) нейрона (рис. 1.3, 2) – трехмерный единый комплекс, занимающий обширное пространство цитоплазмы. Он построен из мембранных компонентов, представленных системой цистерн, многочисленных пузырьков и вакуолей и окружающей их цитоплазмой. Компоненты аппарата Гольджи могут распространяться в начальные сегменты крупных дендритов, а также в районы ветвления отростков. В аксоне они не обнаружены.

В цитоплазме нейрона обнаружено множество лизосом разного диаметра, содержащих набор гидролитических ферментов (в основном это кислые гидролазы). Основная функция лизосом – осуществление процессов автофагии, что связано с постоянно идущей регенерацией основных компонентов клетки.

В тесной морфологической и функциональной связи с АГ и лизосомами находятся мелкие мембранные структуры – мультивезикулярные тела (рис. 1.3, 9) и пузырьки. Эти образования осуществляют транспорт веществ по телу и отросткам нейрона и обмен мембранного материала клетки. Они расположены главным образом в районах синаптических контактов, в аксоне, в конусах роста развивающихся отростков нейрона.

Фибриллярные структуры нейрона – микротрубочки (рис. 1.3, 17–21), нейрофиламенты (рис. 1.3, 16), микрофиламенты формируют в цитоплазме сложную трехмерную опорно-сократимую сеть, которая играет важную роль в функционировании нейронов, в особенности в процессе транспорта веществ внутри перикариона и по отросткам клетки. Микротрубочки нейрона имеют обычное строение. Их диаметр око-

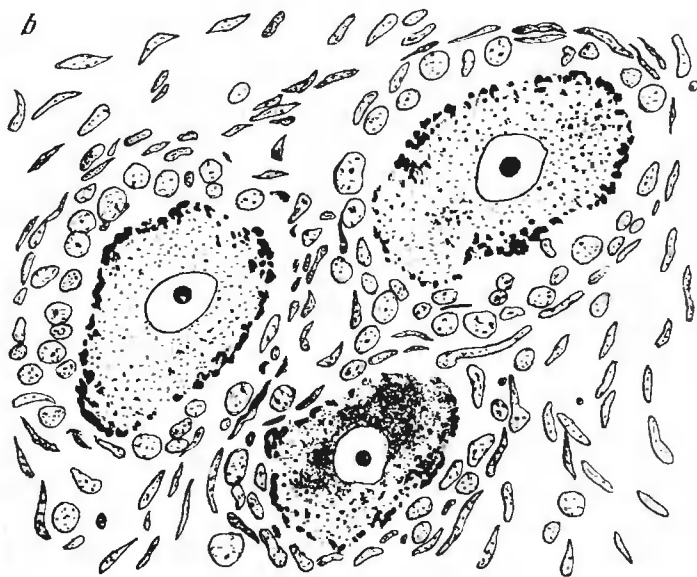
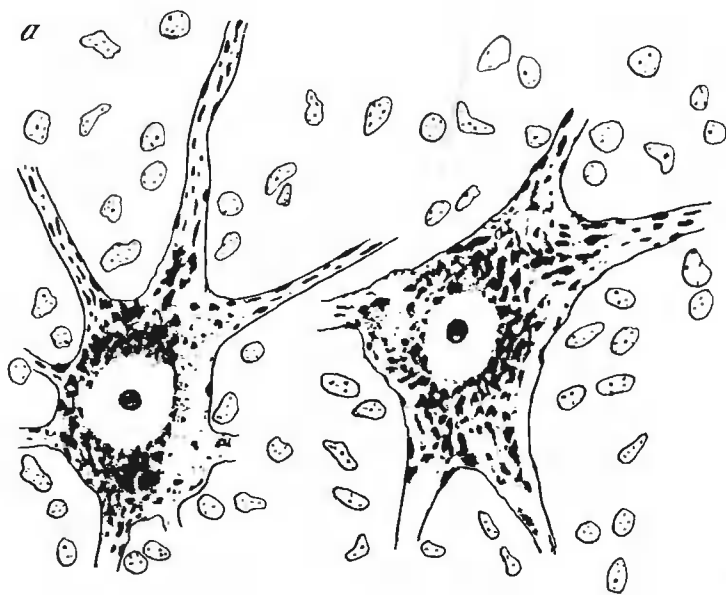


Рис. 1.4. Типы Нислевской субстанции.

a – спинной мозг. Передний рог. Нормальное состояние. Окраска по Ниссию. Мультиполярные двигательные нейроны.

b – спинальный ганглий. Нормальное состояние. Окраска по Ниссию. Чувствительные нервные клетки. Перикарион с желтым и черным пигментом. По Никулеску, 1963.

ло 20–26 нм, они образованы глобулами белка тубулина. Длина микротрубочек в нейроне различна. Они располагаются в цитоплазме нейрона и его отростков либо поодиночке, либо формируя сложные пучки из 20–30 элементов, ориентированных в определенном направлении. В дендритах и аксоне микротрубочки располагаются преимущественно вдоль оси отростка. Нейрофиламенты представлены фибриллярными белковыми структурами, которые относятся к разновидности так называемых “скелетных” филаментов, встречающихся в цитоплазме всех клеток, но состоящих из специфических для нейрона белков. Нейрофиламенты образуют своеобразный цитоскелет нейрона и отростков. Микрофиламенты намного короче микротрубочек и нейрофиламентов и состоят из нейронного актина (нейрина). Они тесно связаны с нейрофиламентами и с синаптическими мембранами, где обнаружен второй сократимый белок – нейрональный миозин (стеннин).

Для митохондрий нервных клеток (рис. 1.3, 3) характерен короткий жизненный цикл, что связано с интенсивностью энергетического обмена. Митохондрии располагаются в цитоплазме сомы и отростков хаотически, но особенно много их скапливается в зоне отхождения аксона (так называемый аксонный холмик, рис. 1.3, 12), в конусах роста развивающихся нейронов.

На периферии перикариона часто встречаются субповерхностные цистерны (рис. 1.3, 7).

Детально изучена и электронно-микроскопическая структура отростков. Дендриты (рис. 1.3, 10), короткие отростки, ветвящиеся вблизи тела нейронов. Для них характерно наличие большого количества микротрубочек и нейрофиламентов, ориентированных вдоль отростка, хорошо развитая сеть цистерн ЭПР, свободные рибосомы. В местах ветвления дендритов в цитоплазме находятся скопления митохондрий и свободных рибосом, цистерн гладкого и шероховатого ЭПР, элементы АГ. Места ветвления дендритов являются важным структурно-функциональным компонентом нейронов и влияют на характер проведения нервных импульсов. Характерная структурная особенность дендритов центральной нервной системы – наличие особых цитоплазматических выростов – шипиков (рис. 1.3, 14). Количество и распределение их по дендриту зависит от типа нейрона. Шипики имеют разные размеры и форму и нередко характеризуются присутствием особой структуры – шипикового аппарата, состоящего из 3–4 уплощенных цистерн, между которыми выявляется прослойка электронно-плотного вещества (рис. 1.3, 14). Они образуют синаптические контакты. Различают аксоаксонные (рис. 1.3, 22) и аксо-шипиковые (рис. 1.3, 23) контакты. При различных воздействиях и функциональных состояниях шипики могут менять свои размеры и форму, наблюдаются картины дегенерации отдельных шипиков, образование новых.

Отдельные участки аксона отличаются друг от друга по ультраструктурной организации и функциональному значению. Участок, прилегающий к телу нейрона, носит название аксонного холмика, в нем генерируется нервный импульс. Размеры аксонного холмика у крупных нейронов достигают 10–30 мкм. Центральную часть его аксоплазмы за-

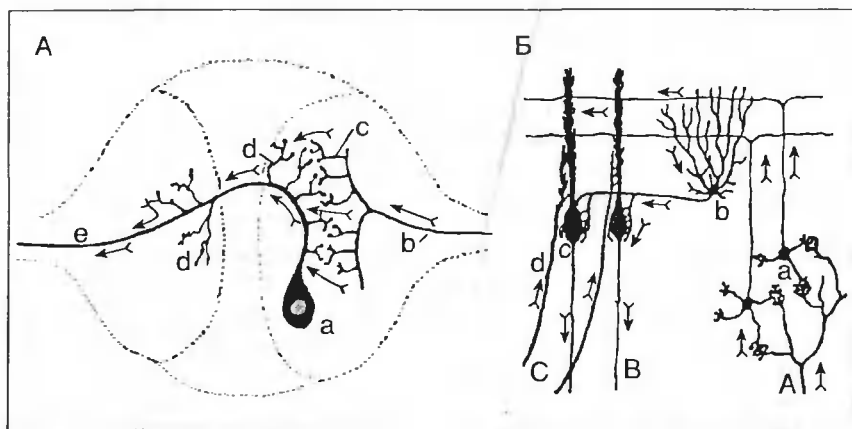


Рис. 1.5. Схемы Кахалы, указывающие направление переноса сигналов в нервных клетках и в нервных сетях в соответствии с “законом динамической поляризации”.

А – Ганглий беспозвоночного, Б – мозжечок. По Кахалю.

нимают продольно ориентированные пучки нейрофиламентов, по периферии располагаются пучки микротрубочек, цистерны ЭПР, отдельные рибосомы, цистерны АГ и сложная сеть микрофиламентов. Электронно-микроскопическая структура расположенного за аксонным холмиком начального отдела аксона, продолжающегося до появления глиальной оболочки, также своеобразна и характеризуется отсутствием рибосом, компонентов АГ и микротрубочек. Зато в нем присутствуют специализированные аксо-аксонные синапсы (рис. 1.3, 22), деятельность которых оказывает сильное влияние на активность нервной клетки. В средних отделах аксона структура аксоплазмы изменяется; одиночные микротрубочки и нейрофиламенты распределяются равномерно, появляется множество мультивезикулярных тел и пузырьков, хорошо развит гладкий ЭПР (рис. 4.3, 15).

4. Анатомическая самостоятельность нейрона выражается в том, что все его части остаются резко отграниченными от таких же частей других нейронов. Чтобы образовать длинные пути, проводящие нервные импульсы, нейроны складываются вместе наподобие отдельных звеньев, образующих цепь. Каждое звено этой цепи, каждый нейрон не сливается при этом с соседним, лишь тесно соприкасается с ним своими отростками. Каждая такая цепь служит для проведения нервных импульсов в определенном направлении, и один конец ее, где воспринимается импульс, является начальным, **рецепторным**, другой, где импульс передается исполнительным элементам, – конечным, **эффекторным**.

5. Нейрон с его отростками является **полярно-дифференцированным** (принцип динамической поляризации нейрона, впервые сформулированный Кахалем), так что дендриты несут рецепторную функцию, и только они и клеточное тело могут воспринимать нервные импульсы,

тогда как аксон проводит эти импульсы от своего начала к концевым телодендриям. Отдельные нейроны в нервных цепях располагаются и соединяются друг с другом в согласии с этой динамической поляризацией (рис. 1.5).

6. Трофическим центром нейрона является перикарион. Именно там происходят основные синтезы необходимых для функционирования клеток компонентов. Отсюда они поступают в отдаленные части нейрона с помощью аксонного транспорта. Различают прямой и обратный, быстрый и медленный транспорт, они охарактеризованы в табл. 1.

7. Нейронные цепи (ансамбли) способны осуществлять рефлекторные реакции, являющиеся по определению Чарлза Шеррингтона элементарными единицами поведения. Само слово рефлекс появилось в XVIII в. Одним из первых употребил его в 1784 г. венский исследователь Георг Прохазка. Современный смысл понятие “рефлекс” приобрело в связи с первыми экспериментами по изучению роли спинного мозга в двигательных реакциях в ответ на разные раздражители. Важнейшие работы в этом направлении были выполнены английским ученым Чарлзом Беллом и французским ученым Франсуа Мажанди. В 1820 г. они установили, что чувствительные нервные волокна спинного мозга проходят в задних корешках спинномозговых нервов, а двигательные – в передних корешках.

Первым, рецепторным (периферическим, чувствительным) нейроном рефлекторной дуги является сенсорный нейрон спинномозгового

Таблица 1. Типы аксонного транспорта

Компонент	Скорость, мм/день	Транспортируемый материал	Морфологический субстрат транспорта
Прямой быстрый	200–400	Гликопептиды, гликолипиды, белки, медиаторы, ферменты, ионы кальция	Пузырьки, цистерны, ЭПР, нейросекреторные гранулы
Промежуточный	50	Митохондриальные белки	Митохондрии
	15 2–4	Миозиноподобные белки Актин, клатрин, калмодулин, ферменты, белки аксоплазмы	Микрофиламенты
Медленный	0,2–1,0	Белки нейрофиламентов, тубулин, белки аксоплазмы	Микротрубочки, нейрофиламенты, аксоплазма
Обратный быстрый	100–200	Нейроростовые факторы, лизосомные ферменты, трофические вещества	Лизосомы, цистерны ЭПР, мультивезикулярные тела



Великий физиолог Чарлз Шеррингтон, лауреат Нобелевской премии. Заложил начала современной нейрофизиологии, развил учение о безусловных и условных рефлексах. Сформулировал представления о синапсе и его роли в процессе возбуждения и торможения. Его работы легли в основу современных представлений о физиологических механизмах высшей нервной деятельности.

узла с Т-образным отростком. Периферическая ветвь воспринимает где-то на поверхности организма импульс и проводит его в центральный отросток – аксон. Он делится в белом веществе спинного мозга Т-образно на восходящую и нисходящую ветви, а он них отходит множество коллатералей на разных уровнях, и все они связываются с дендритами нейронов второго порядка – пучковых клеток спинного мозга. От каждой пучковой клетки отходит аксон, также делящийся Т-образно и образующий ветви, которые связываются с дендритами нейронов третьего порядка, опять же на разных этажах спинного мозга. Таковыми являются моторные (двигательные) нейроны передних рогов спинного мозга. Аксоны моторных клеток выходят из спинного мозга через передние корешки, вступают в двигательные нервные волокна и идут к мышцам, где разветвляются, образуя нервные окончания, и передают импульс, вызывающий сокращение мышц.

8. Как уже отмечалось, каждый аксон оканчивается на теле или дендритах других нейронов контактом, названном синапсом. С помощью электронной микроскопии структура синапса изучена достаточно хорошо (рис. 1.6).

Синаптический контакт состоит из трех компонентов; **пресинаптической области** (пресинапс), **синаптической щели** и **постсинаптической области** (постсинапс). Для **пресинаптической** зоны наиболее характерным является наличие синаптических пузырьков; их вид, размеры и содержимое определяют тип синапса. Синаптические пузырьки содержат медиатор, фермент аденозинтрифосфатазу, обеспечивающую энергией процесс захвата и секреции медиатора, ионы кальция. На мембране пузырьков найден сократимый белок миозин. Синаптические пузырьки формируются в районе аппарата Гольджи, а затем доставляются по аксону в синапс. В пресинапсе обнаружено также большое количество митохондрий (в крупных окончаниях несколько десятков). Кроме основной энергетической функции они служат резервуаром для ионов кальция и принимают участие в синтезе и утилизации многих медиаторов. В

пресинапсе много микротрубочек, богатая сеть цистерн эндоплазматического ретикулама и микрофиламентов. Важной частью синаптического контакта является участок пресинаптической мембраны, где происходит выброс медиатора в синаптическую щель – это активная зона синапса. На внутренней поверхности мембраны этого участка расположены многочисленные субмембранные утолщения, образующие правильную гексагональную решетку. Активная зона обеспечивает подход синаптических пузырьков к пресинаптической мембране и выделение их содержимого в синаптическую щель. В этом процессе основную роль играет механохимическое взаимодействие актина (нейрина) плотных тел и миозина, находящегося на мембране синаптических пузырьков.

Синаптическая щель представляет собой узкую 20–50 Å полосу межклеточного пространства, отделяющую нейроны друг от друга в зоне синапса. Содержимое синаптической щели обеспечивает направленную диффузию медиатора и его взаимодействие с рецепторами постсинаптической мембраны. Открытие синаптической щели окончательно подтвердило правильность нейронной теории Рамон-и-Кахала.

Постсинаптическая часть синапса может быть образована любой частью нейрона или его отростков. Важнейшим компонентом постсинаптической мембраны являются специализированные мембранные белковые комплексы – рецепторы, обеспечивающие рецепцию медиатора и новообразование нервного импульса.

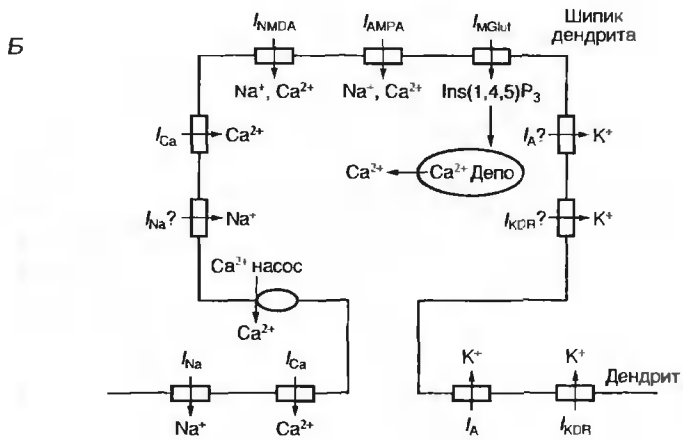
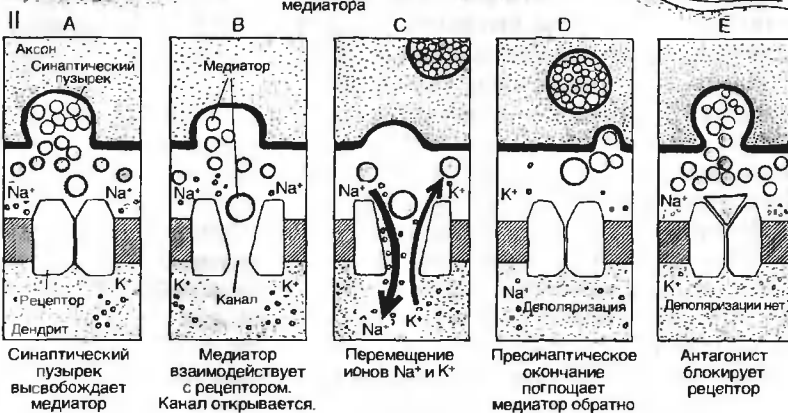
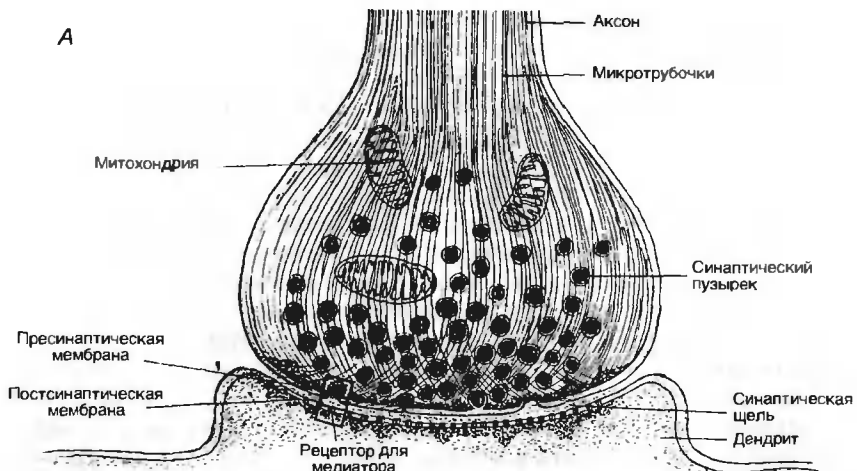
Непосредственно к постсинаптической мембране изнутри примыкает сложная фибриллярная сеть, названная **постсинаптическим утолщением**. Она предназначена для стабилизации в постсинаптической мембране рецепторных комплексов и осуществления связи с цитоплазмой постсинапса.

В зависимости от степени развития пре- и постсинаптических утолщений синапсы подразделяют на два типа (по Грею).

Симметричные контакты (I тип), у которых оба компонента развиты достаточно сильно, а **асимметричные** контактные (II тип), у которых постсинаптическое утолщение развито слабо.

Синаптический контакт могут образовать разные части нейрона, потому можно различить семь основных типов синапсов: аксо-соматические, аксо-дендритические, аксо-аксональные, дендро-дендритические, дендро-соматические, сомато-соматические, сомато-дендритические.

9. Передача нервного импульса в области синапса осуществляется с помощью медиаторов (существуют, правда, еще и специфические синапсы, так называемые электротонические, которые приспособлены для прямой передачи электрического импульса с одного нейрона на другой. Они характеризуются отсутствием различия в структуре пре- и постсинаптической мембран). Каждый нейрон характеризуется специфическим медиатором, который он вырабатывает. Это качество называется эргичностью. Как правило, нейрон синтезирует только один медиатор (принцип Дэйла), хотя в последнее время показано, что во многих нервных клетках может сосуществовать два медиатора. Начало



учению о медиаторах как химических передатчиках нервного импульса положила в 1900 г. школа уже ранее упомянутого английского физиолога Дж. Лэнгли (J. Langley).

Они изучали иннервацию внутренних органов и обнаружили, что электрическая стимуляция соответствующих нервов вызывает повышение частоты сокращений сердца, изменяет артериальное давление и т.д. Оказалось также, что эти эффекты можно имитировать инъекцией экстрактов надпочечника. Было доказано, что импульсы в этих нервах вызывает выделение вещества типа адреналина на поверхность эффекторных клеток. В 1921 г. О. Леви (O. Loewi) в Австрии обнаружил тормозящее действие сердца вещество ацетилхолин. В дальнейшем были обнаружены многочисленные другие химические передатчики нервного импульса с возбуждающим или тормозящим эффектом. Перечень их и родственных им соединений приведен на рис. 1.7.

Следует отметить, что несмотря на различия циркуляторных систем и метаболических путей, беспозвоночные и позвоночные в равной степени используют большинство тех медиаторов, которые изображены на рис. 1.7. Поразительное свидетельство консерватизма природы!

Медиаторы, выделяемые через пресинаптическую мембрану, воспринимаются рецепторными молекулами, расположенными в постсинаптической мембране. На рис. 1.8 показано несколько главных типов рецепции, как их представляют на молекулярном уровне. Как следует из рис. 1.8, А, ацетилхолин (АХ) действует непосредственно на рецепторный белок в постсинаптической мембране. АХ называют лигандом, когда имеют в виду, что он связывается с определенным участком белка. Это вызывает изменение проницаемости мембраны, при этом реакция мембраны может быть быстрой или медленной в зависимости от того, с каким типом рецептора свяжется АХ. Известны два типа АХ-воспринимающих рецепторов – никотиновый и мускариновый. Никотиновый может быть возбужден никотином, а мускариновый избирательно отвечает на аппликацию мускарина. Физиологически важным различием между ними является скорость ответа на поступающий сигнал, первый характеризуется быстрым и непродолжительным эффектом, второй – медленным и длительным. Действие АХ прерывается гидролизом, наступающим в результате действия фермента ацетилхолинэстеразы, с обратным захватом продукта распада – холина в пресинаптическое окончание.

Для сравнения на рис. 1.8, Б продемонстрировано действие гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), которая выделяется тормозящими синапсами и может связываться с двумя типами мембранных рецепторов – с высоким и низким сродством. Эти рецепторы, в свою очередь, контролируют ионофор (канал проводимости) для ионов Cl^- , которые движутся во время вызванных ГАМК реакций. Блокаторы ГАМК – пикротоксин и биккуллин – действуют в специфических участках на ре-



Рис. 1.6. Процессы, протекающие в синапсе.

А – схема выброса медиатора и процессов, происходящих в синапсе;

Б – схема процессов в шипке.

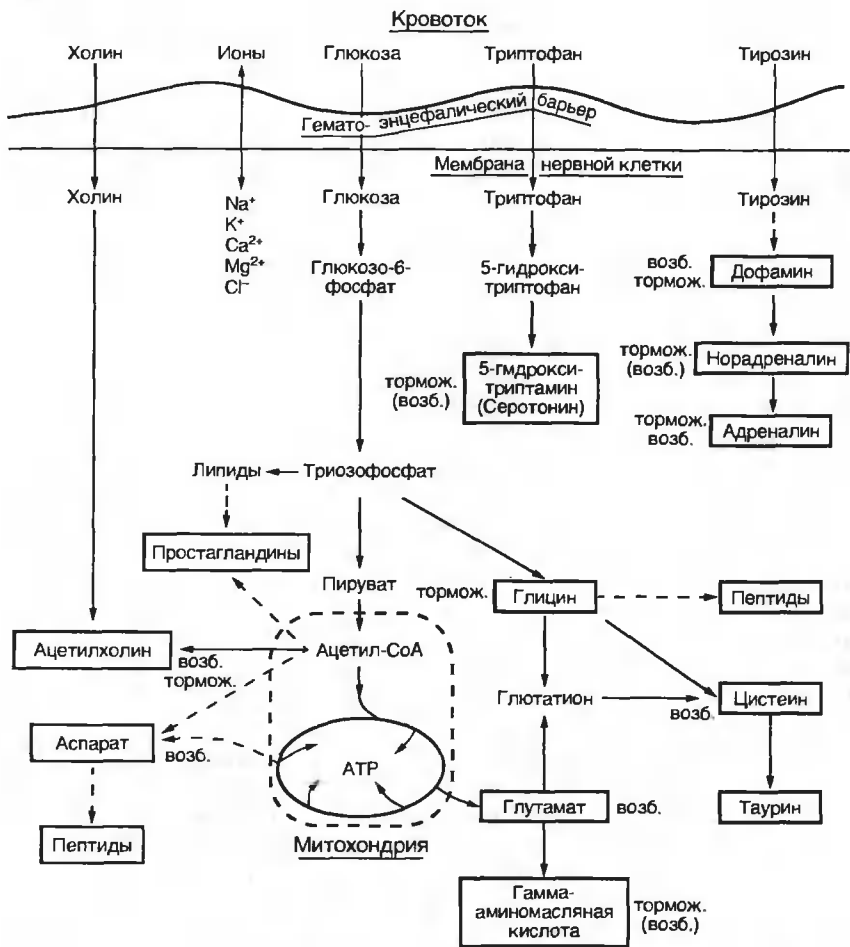


Рис. 1.7. Перечень медиаторов и родственных им соединений, а также некоторые пути их транспорта из кровотока и метаболизма внутри нервных клеток. По Cooper et al., 1982.

цепторный белковый комплекс и нарушают контроль ГАМК над ионфорами для Cl⁻. Так называемые бензодиазепиновые препараты вызывают угнетение ГАМК-эргических синапсов и вследствие этого используются для лечения тревожных состояний и депрессий, вызываемых избытком ГАМК. На схеме показано, что ГАМК удаляется из синаптической щели путем захвата пресинаптическим окончанием, а также клетками глии.

Третий распространенный тип механизма рецепции продемонстрирован на рис. 1.8, В. Молекула медиатора и в этом случае связывается с мембранным белком, причем имеется механизм для очищения вещи и для обратного захвата. Однако последующая реакция в постсинаптической

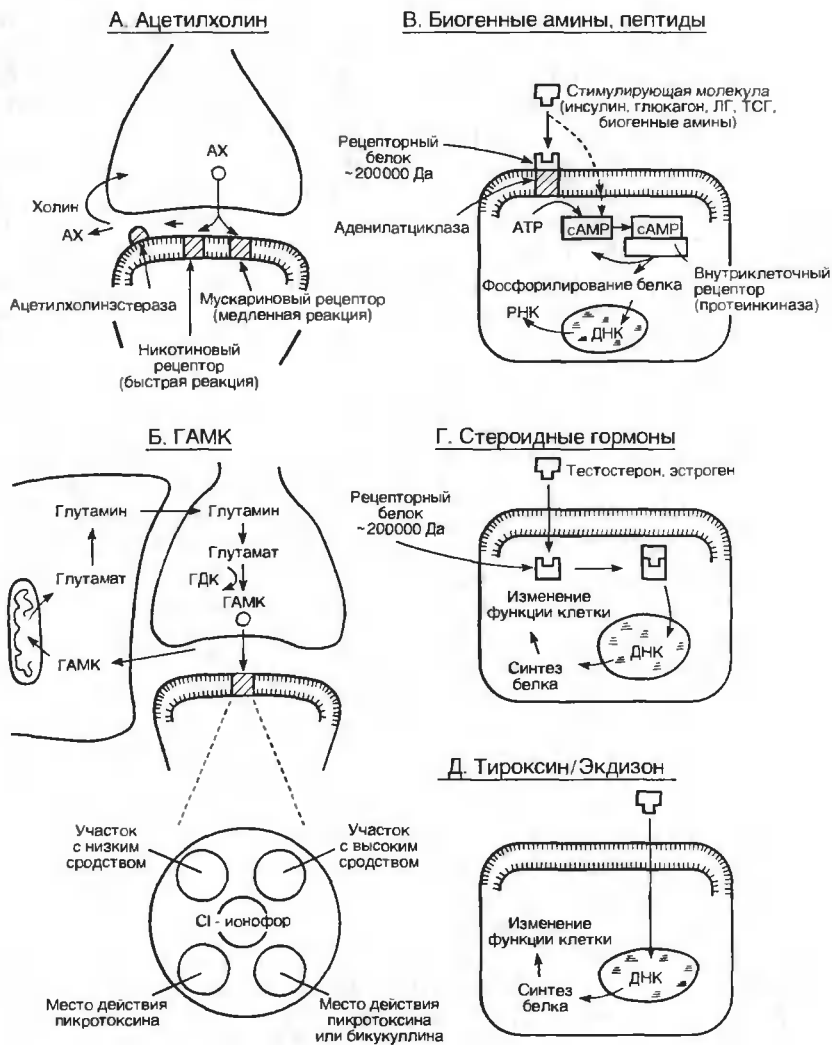


Рис. 1.8. Молекулярные механизмы рецепции различных нейроактивных веществ (ГДК – глутаматдекарбоксилаза).

Обозначения в тексте.

ском окончании более сложная. Рецепторный белок активирует через систему фермента аденилатциклазу внутренний рецептор – протеинкиназу, которая катализирует фосфорилирование белка, в результате чего изменяется ионная проводимость мембраны. Такая модель со “вторичным посредником” была впервые разработана для гормона инсулина Е. Сазерлендом (Е. Sutherland) с сотрудниками и впоследствии распространена на нервную систему. Подобный механизм участвует в опо-

средовании реакции на биогенные амины, люлиберин, тиреолиберин и др. Кроме мембраны и смежной с ней цитоплазмы в эту реакцию может быть вовлечен и геном клетки в результате воздействия на ДНК, что может привести к долговременному изменению метаболизма клеток в процессе их роста и дифференцировки.

На рис. 1.8, Г можно видеть механизм действия стероидного гормона. В этом случае рецепторный белок полностью находится в цитоплазме. Комплекс гормон–рецептор оказывает свое специфическое действие на ядерную ДНК. Имеется два типа влияний, – организующие, характерные для периода развития (например, контроль половыми гормонами выраженности мужских и женских половых признаков), и активационные, которые вызывают более быстрые изменения клеточных функций.

Близкий тип гормонального действия представлен на рис. 1.8, Д. Здесь гормон входит в клетку и действует непосредственно на ядерную ДНК. Это применимо к гормону тироксину, а также к стероидному гормону беспозвоночных – экдизону. Экдизон контролирует линьку при переходе насекомых от личиночных стадий к взрослым формам.

Таким образом, существует несколько различных типов механизмов, осуществляющих связывание высвобожденной молекулы медиатора с рецепторной молекулой и вызывающих последующие изменения в постсинаптическом нейроне. Когда эти изменения происходят на мембране, вызывая синаптический потенциал, высвобожденная молекула действует как медиатор. Изменения, которые происходят в других частях клетки (цитоплазме или ядре), вызывают более сложные эффекты. В этом случае высвобожденные молекулы, которые иницируют их, являются модуляторами. Этот термин применяют также к случаям, когда какое-то вещество влияет на выделение, связывание или действие медиатора.

10. Наряду с нейронами, нервная ткань содержит вспомогательные элементы – глиальные клетки. Они были впервые выделены в отдельную группу в 1871 г. великим немецким ученым Рудольфом Вирховом.

Принято различать четыре типа глиальных клеток: **астроциты**, **олигодендроциты**, клетки **эпендимы** и **микроглии** (рис. 1.9).

Первые три разновидности глиальных клеток образуются в эмбриогенезе, как и нейроны, из нейроэктодермы. **Микроглии** приписывают мезенхимное происхождение. Глиальные клетки выполняют целый ряд важных функций; опорно-механическую, где основная роль принадлежит астроцитам, трофическую, поскольку в глиии много гликогена (главного энергетического субстрата мозга) и липидов. Глиальные клетки способны контролировать ионный состав межклеточной жидкости, что обеспечивает стабильность внутренней среды мозга и, следовательно, условия нормального функционирования нервной ткани. Глия осуществляет также дренажную функцию, очищая межклеточное пространство от продуктов дегенерации нейронов и прочих вредных продуктов.

Астроциты и олигодендроциты могут также активно захватывать из синаптической щели медиаторы или их составные части после окон-

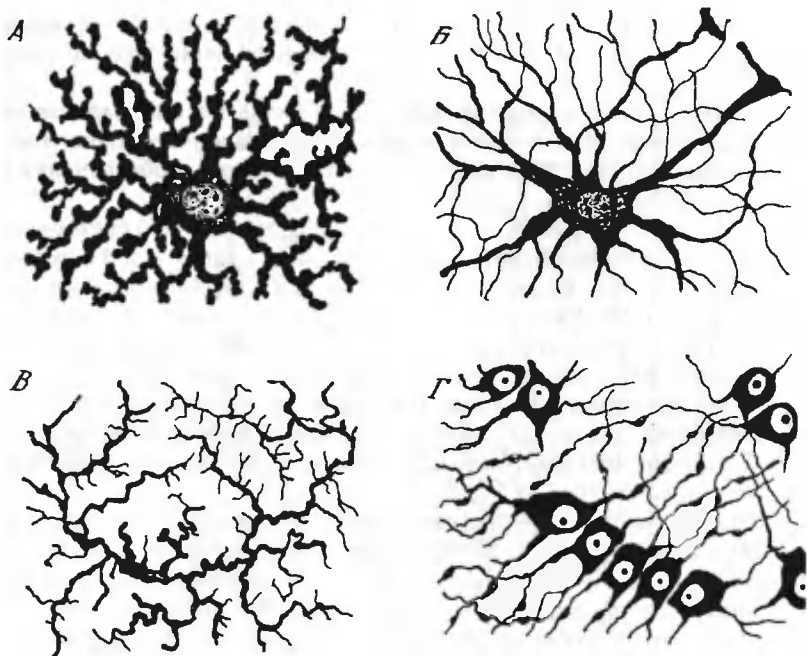


Рис. 1.9. Разные типы нейрологии.

A – протоплазматические астроциты; *Б* – фиброзные астроциты; *В* – микроглии; *Г* – олигодендроциты. По Rio-Hortega, 1975.

чания синаптической передачи. В частности, целиком захватываются глией такие медиаторы, как катехоламины, ГАМК, ряд пептидов, аминокислотные медиаторы. Затем глия возвращает медиатор нейрону.

В мозге астроциты и олигодендроциты образуют множество плотных контактов как друг с другом, так и с нейронами. Одной из основных задач глии является обеспечение надежной электрической изоляции тел нейронов, их отростков и синапсов для исключения неадекватного взаимодействия между нейронами при распространении возбуждения по нейронным цепям мозга. В ЦНС олигодендроциты образуют многочисленные тонкие отростки, каждый из которых закручивается вокруг аксона нейрона. При этом отростки постепенно уплотняются и теряют свое цитоплазматическое содержимое, формируя вокруг аксона плотный слой мембран и превращаясь в миелиновую (мякотную) оболочку. В периферической и автономной нервной системе миелиновую оболочку образуют шванновские клетки. В этом случае аксон постепенно погружается во впячивание глиальной клетки, и вокруг него начинается формирование глиальной оболочки.

Эпендимная глия образует выстилку полостей мозговых желудочков и центрального канала спинного мозга. Она представлена кубовидными или цилиндрическими клетками, на апикальной поверхности ко-

торых находится одна или несколько ресничек. Некоторые эпендимные клетки имеют длинные цитоплазматические отростки, глубоко внедряющиеся в ткань мозга.

Одной из разновидностей астроцитов являются специализированные “радиальные” глиальные клетки коры полушарий головного мозга и мозжечка, которые принимают активное участие в обеспечении миграции нейробластов.

11. Нейронные элементы различных отделов нервной системы объединяются в группы, ансамбли, составляющие единое морфофункциональное целое. Эти ансамбли формируются в процессе индивидуального развития и получили название модули. Еще Рамон-и-Кахал перечислил различные типы синаптической организации и несколько своеобразных форм организации групп нервных клеток и их отростков – “клубочки” обонятельной луковицы и коры мозжечка, плотные корзинчатые сплетения аксонных терминалей, охватывающих большее или меньшее число постсинаптических перикарионов, что по существу соответствует модулям.

Однако современные представления о модульной организации мозга были сформулированы М. Шейбелом (M. Scheibel) и А. Шейбел (A. Scheibel) при описании ретикулярной формации ствола мозга. Они обнаружили, что как дендритные ветвления отдельных нейронов, так и терминальные ветвления отдельных аксонных коллатералей, входящих в серое вещество ретикулярной формации из продольных пучков нервных волокон, ветвятся в пределах относительно узких, поперечно ориентированных “дисков”. Авторы представили ретикулярную формацию как серию дискообразных модулей перпендикулярной к оси мозга ориентации, сложенных в стопку. В дальнейшем выяснилось, что подобная организация нейронов и их отростков в виде стопки дисков еще лучше выражена в промежуточной области и передних рогах спинного мозга (рис. 1.10), а также и в других отделах мозга.

В *substantia gelatinosa* спинного мозга модули имеют вид продольно ориентированных пластин длиной в несколько сотен микрон и шириной менее 10 мкм.

Судя по рис. 1.10, промежуточная область спинного мозга рассматривается как заполненная дисками, содержащими возбуждающие (светлые) и тормозные (черные) интернейроны. Аксонный нейропил (совокупность отростков) переднего рога организован в форме аналогичных поперечно ориентированных дисков, содержащих дополнительные интернейроны, из которых лишь один вид, так называемая клетка Реншоу, показан на верхнем диске. Мотонейроны пронзают ряд последовательных дисков переднего рога и образуют в каждом диске синапсы, контактирующие с соответствующей цилиндрической частью сомы нейрона или с цилиндрическими отрезками дендритов. Связи, особенно внутри дисков нейропиля промежуточной области, можно считать не жестко адресованными. Однако довольно высокая степень упорядоченности вносится в подобную систему связей набором “инструкций”, определяющих, на каком расстоянии продольно ориентированные аксоны нескольких типов клеток должны посылать коллатерали к соседним

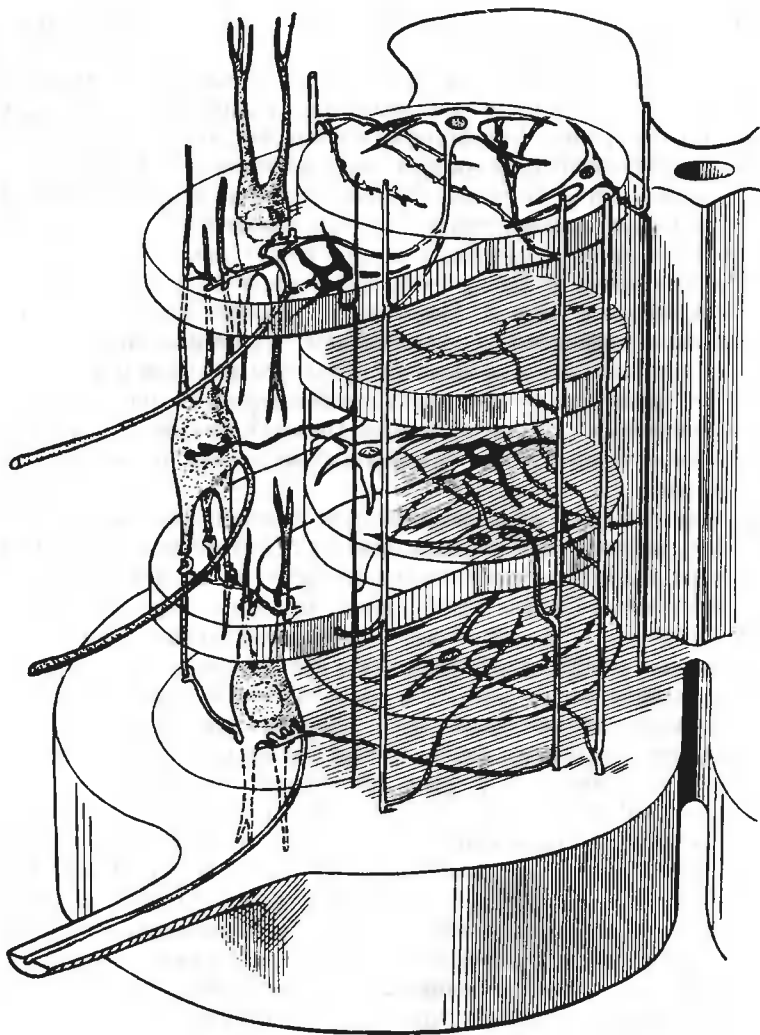


Рис. 1.10. Модель серого вещества спинного мозга в форме “стопки дисков”, основанная на идеях Сентаготаи, А. Шейбел и М. Шейбела.

или более отдаленным дискам серого вещества. На основании наблюдений функциональных возможностей изолированных сегментов медуллярной трубки предполагают, что минимальная нейронная цепь, способная создавать координированные движения, будет подобна той, что изображена на этой схеме.

В коре головного мозга модули имеют форму колонки. Диаметр такой колонки, пронизывающей все корковые слои, определяется диаметром зоны распространения афферентных волокон, который может

варьировать от 10–20 до 300 мкм. Наиболее узкие колонки наблюдаются в зрительной коре.

Именно модульная организация мозга объясняет тот факт, что в коре головного мозга высших позвоночных (мышь, обезьяна, человек) на единицу поверхности приходится одинаковое количество нейронов. Если условно выделить в коре цилиндр диаметром 30 мкм, проходящий через все слои коры, то он будет включать примерно 110 нейронов, и это соответствует одному модулю. В коре головного мозга обнаружено около 600 миллионов колонок, в каждой из которых содержится от 140 (у млекопитающих) до 260 (у приматов) нейронов.

Согласно концепции А. Маунткастла (Mountcastle), корковые модули (колонки) образуют сложную систему, в которой элементы соединены последовательно и параллельно, так что функция одного модуля определяется не только его собственными внутренними связями, но и взаимодействием с другими модулями. Иными словами, модуль представляет собой основную и элементарную функциональную единицу нервной системы.

Именно модули и их взаимодействие обеспечивают осуществление как простых, так и сложных поведенческих актов. Вот как, например, обеспечивается вентиляция (дыхание) у саранчи, где механизмы управления вентиляцией исследованы наиболее детально. Генерирующий вентиляционный ритм у этого насекомого – пейсмейкер (водитель, регулятор ритма) – представлен одиночным интернейроном или небольшой группой интернейронов (рис. 1.11, 1). В каждом сегментарном ганглии имеется набор экспираторных (4) и инспираторных (5) двигательных нейронов, причем инспираторные мотонейроны обладают фоновой (тонической) активностью. Инспираторные мотонейроны с помощью интернейронов (6) способны тормозить активность экспираторных нейронов. Между собой как инспираторные, так и экспираторные нейроны имеют слабо выраженные положительные связи. Входом в ганглий служит интернейрон (3), который суммирует поступающие от интернейрона–пейсмейкера импульсы и передает их на экспираторные мотонейроны. Интернейроны-сумматоры соседних ганглиев связаны между собой. Координацию работы сегментарных вентиляторных центров всех ганглиев обеспечивают координирующие интернейроны (2), идущие от заднегрудного до последнего брюшного ганглия. С каждой стороны нервной цепочки имеется по одному такому интернейрону. Во время управления вентиляцией события в нервной системе разворачиваются следующим образом.

Пейсмейкерные интернейроны (1) во время генерации всплески импульсов тормозят активность авторитмично работающих координирующих интернейронов (2). Вследствие этого интернейрон (2) функционирует лишь в межспайковый (промежуток между импульсами) для пейсмейкера промежуток времени. Интернейрон (2) активирует интернейрон (3) и соответственно группу экспираторных мотонейронов (4), в результате чего обеспечиваются начало, продолжительность и интенсивность всплесков активности в экспираторных мотонейронах. Напротив, фаза молчания пейсмейкера (а значит, фаза активности координиру-

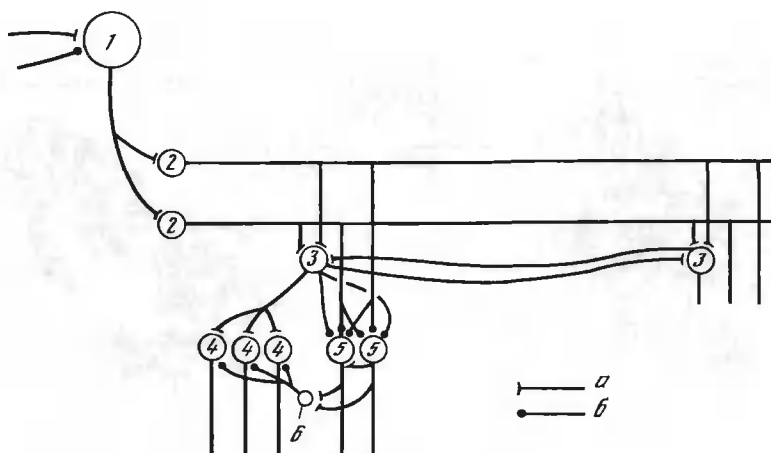


Рис. 1.11. Схема, демонстрирующая некоторые особенности координации вентиляторных движений брюшка саранчи. По Lewis et al., 1973.

a – возбуждающие, *б* – тормозные влияния. Остальные объяснения в тексте.

ющего нейрона, тормозящего действие инспираторных нейронов) определяет продолжительность вспышки импульсов в инспираторных мотонейронах (5), которые разряжаются в этот период спонтанно. Деятельность пейсмекера находится под контролем возбуждающих и тормозных воздействий со стороны высших центров, расположенных в грудных и головных ганглиях.

Более сложные акты осуществляются посредством взаимодействия множества модулей, расположенных на разных уровнях. Как, например, возникает та нервная активность, которую мы называем зрительным восприятием или зрением? Сетчатка нашего глаза содержит более 110 миллионов светочувствительных клеток. Глаз соединен с мозгом нервным трактом, содержащим примерно миллион нервных волокон. Количество светочувствительных клеток в сетчатке превышает число связанных с ними волокон зрительного нерва. Следовательно, каждое волокно собирает информацию от многих индивидуальных клеток. Зрительные нервы оканчиваются в участках мозга, называемых **боковыми коленчатыми телами**, где они образуют синапсы с комплексом из многих миллионов нейронов, которые в свою очередь связаны с особым отделом коры головного мозга (**зрительной корой**) системой проводящих путей, сходных у всех млекопитающих. Зрительные сигналы, преобразованные сетчаткой в нервные импульсы, концентрируются сначала в зрительных нервах, а затем всвобождаются в боковом коленчатом теле. Для того чтобы мозг мог интерпретировать изображение, поступающее на сетчатку глаз, зрительные пути должны быть определенным образом упорядочены. Оказалось, что взаимное расположение элементов сетчатки точно воспроизводится на нейронах коленчатого

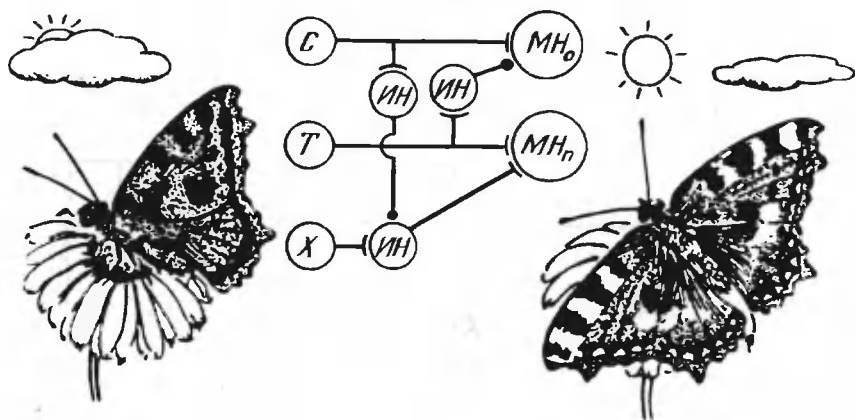


Рис. 1.12. Вариант нейронной сети, управляющей поведением крыльев бабочки крапивницы. По Беркинблиту.

тела, а последние точно так же проецируются на зрительную кору. Иными словами, в боковом коленчатом теле существует **карта** (проекция) сетчатки, а в зрительной коре – **еще одна карта**, проекция соответствующих участков боковых коленчатых тел на вполне определенные, соответствующие им зоны зрительной коры. На каждом уровне картирования – в сетчатке, коленчатом теле и зрительной коре – **информация анализируется и классифицируется на сигналы о границах, углах, движении, длине волны (цвете) и т.п.** Сходным образом организовано взаимодействие модулей, обеспечивающих функционирование других органов чувств.

Структурой модулей активно занимаются работающие в области нейрофизиологии математики (они обычно называют модули нервными сетями). Они разработали метод построения модельных нервных сетей, правильность которого можно проверить в эксперименте. Приведем пример такого рода из работы российского нейрофизиолога М. Беркинблита.

Известно, что бабочка крапивница предпочитает температуру тела 36°C . Если на улице холодно и Солнце не светит, она сидит с закрытыми крыльями. Если холодно, но светит солнце, бабочка открывает крылья. Как построена нервная сеть (модуль), управляющая таким поведением бабочки? На рис. 1.12 показана приведенная Беркинблитом схема такой нервной сети. Имеется три рецептора: C – световой, который возбуждается, когда светит солнце, T – тепловой, который возбуждается, когда температура бабочки равна или выше 36°C , X – холодовой, который возбуждается, когда температура тела бабочки ниже 36°C . Если на улице холодно и не светит солнце, то рецептор X активирует интернейрон, который вызывает возбуждение мотонейрона MH_n , иннервирующего мышцы-подниматели крыла, и бабочка складывает крылья. Если на улице холодно, но светит солнце, то рецептор C возбуждает нейрон

MNo, который вызывает сокращение мышц-опускателей крыльев, одновременно подается импульс на тормозный интернейрон (закрашен на схеме), блокирующий активность интернейрона, возбуждающего *MNn*, так что бабочка открывает крылья. Наконец, если на улице тепло, то от рецептора *T* идет возбуждающий импульс на мотонейрон *MNn* и активируется заштрихованный интернейрон, который тормозит *MNo*, так что крылья бабочки опять-таки сложены.

Совершенно очевидно, что поведение животного формируется в процессе онтогенеза в зависимости от дифференцировки различных модульных систем.

ЛИТЕРАТУРА*

- Мозг: Сборник. М.: Мир, 1984. 250 с.
Мозг: Разум и поведение: Сборник. М.: Мир, 1988. 300 с.
Оленев С.Н. Развивающийся мозг. М.: Наука, 1978. 214 с.

* Литература, рекомендуемая к каждой главе, охватывает лишь некоторый минимум обзорных работ, посвященных соответствующей теме.

ФОРМИРОВАНИЕ МЕЖНЕЙРОННЫХ СВЯЗЕЙ И ПОВЕДЕНИЕ

Организация нервной системы и поведение. Филогенетический аспект

В процессе филогенеза выявилось четыре направления в развитии нервной системы.

1. Увеличение клеточного разнообразия, появление все новых и новых типов нервных клеток.

2. Увеличение количества нервных клеток и соответственно синаптических контактов в пределах функционально единой нервной цепи (принцип эволюционного расщепления структур, сформулированный великим русским гистологом А.А. Заварзиным, сущность которого показана на рис. 2.1, *a, b*).

3. Тенденция к сегрегации, когда сходные типы нейронов группируются вместе, формируя нервноклеточные ядра и пучки волокон.

4. Централизация, развитие отделов нервной системы, интегрирующих деятельность нижестоящих центров.

Эволюционные преобразования организации нервной системы происходят в соответствии с теорией параллельных рядов, сформулированной в 30-е годы А.А. Заварзиным.

Согласно этой теории одинаковые ткани у всех животных, даже самых различных по своему происхождению, прodelьывают сходную эволюцию. Образуются, таким образом, параллельные ряды тканевого филогенеза соответственно положению таксонов на филогенетическом древе (см. рис. 2.2), и, следовательно, гистологическая организация нервной ткани, например, у *Tunicata* и *Mollusca* или у *Vertebrata* и *Insecta* (на схеме дано шире – *Arthropoda*) сходны, так что нейрональные отношения, например в оптических центрах, образуют параллели.

В ходе эволюции формируются нервные центры (ганглии), т.е. такие места, где осуществляется стык двух или нескольких нейронов, иными словами, там, где имеется синапс, а значит, и качественные изменения нервного импульса. Известны два типа организации нервных центров.

1. **Ядерный**, когда нейроны и синаптические участки расположены компактно и лежат без особого порядка (например, различные подкорковые ядра или ядра ствола мозга).

2. **Экранный**, когда структурные элементы расположены в виде геометрически правильных слоистых структур (например, кора головного мозга) (рис. 2.3).

Впервые нервная система появляется у кишечнoполостных: гидр,

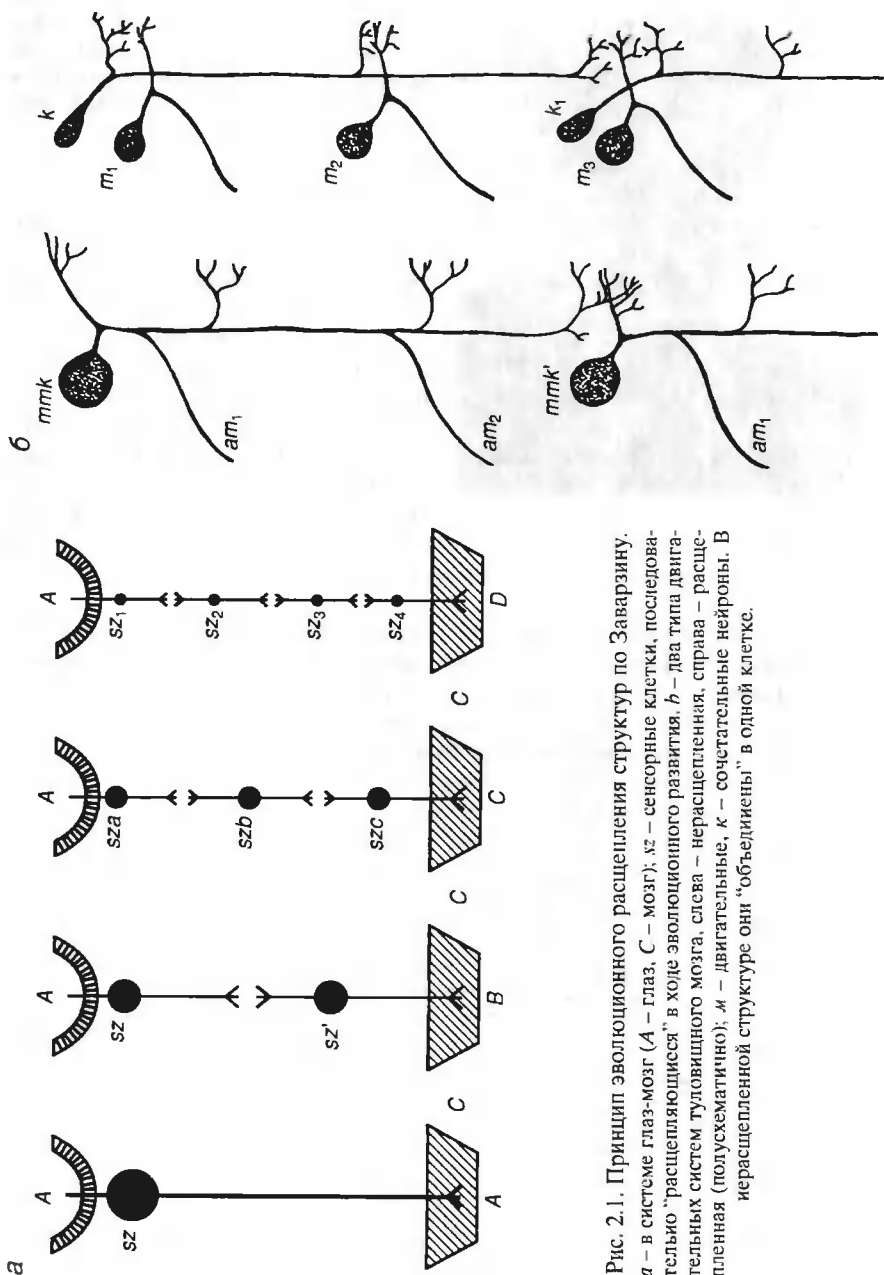


Рис. 2.1. Принцип эволюционного расщепления структур по Заварзину. *a* – в системе глаз-мозг (А – глаз, С – мозг); sz – сенсорные клетки, последовательно “расщепляющиеся” в ходе эволюционного развития, *b* – два типа двигательных систем туловищного мозга, слева – нерасщепленная, справа – расщепленная (полусхематично); *m* – двигательные, *k* – сочетательные нейроны. В нерасщепленной структуре они “объединены” в одной клетке.



А.А. Заварзин. великий российский гистолог, классик сравнительной гистологии, открыл параллелизмы в развитии тканевых систем, обнаружил эволюционное расщепление структур и сформулировал закон тканевой эволюции.

медуз, амфибий и кораллов. Первоначально она представлена примитивной однородной диффузной сетью, но вскоре наблюдается ее расчленение и значительное разделение функций с определенной степенью централизации.

У гидры нервная система состоит из двух функциональных отделов: рецепторных клеток, воспринимающих внешние раздражения: клеток,

проводящих возбуждение к различным частям тела; эффекторных клеток, реагирующих движением на изменения во внешней среде (рис. 2.4).

У таких радиально-симметричных животных, как медуза или морские звезды, в организации нервной системы отмечаются **признаки централизации**. У медузы некоторые отростки нейронов удлиннились и сгруппировались в параллельные пучки, так что образовались два нервных кольца, заключенных в колоколе (рис. 2.5).

Элементы централизации способствуют более быстрому проведению возбуждения, чем в случае диффузной нервной системы.

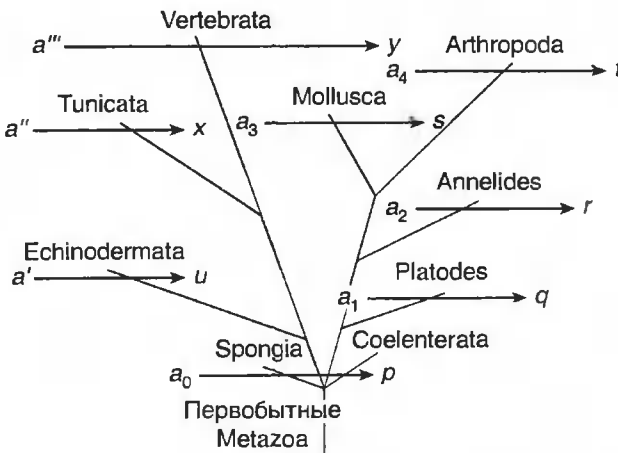


Рис. 2.2. Схема параллельных рядов тканевой эволюции. По Заварзину, 1945.

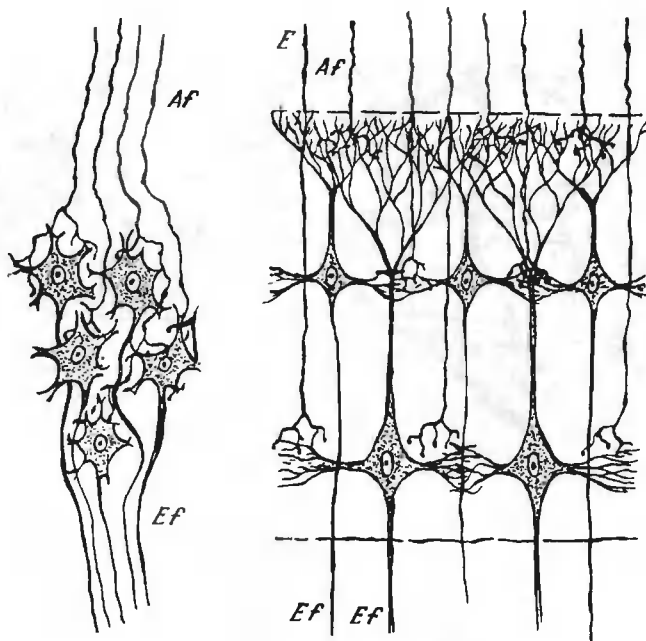


Рис. 2.3. Схема строения ядерного (слева) и экранного (справа) нервных центров. Af – афферентные волокна, Ef – эфферентные волокна. По Заварзину, 1941.

Первые настоящие органы чувств найдены у медузы. Одни из них – глазки – реагируют на свет, другие –статоцисты – на изменение положения тела (рис. 2.5).

Поведение кишечнотолостных характеризуется простотой, соответствующей простоте организации нервной системы. В основном их поведенческие реакции связаны с питанием, движением и защитой от вредных воздействий. Все эти реакции являются медленными, стереотипными, и изолированные фрагменты тела реагируют так же, как и животное в целом. Основой плавательных движений у медузы является спонтанная активность, свойственная нервному кольцу. Она обуславливает сильные сокращения вентральной поверхности животного, ритмично выталкивающей воду из колокола, что и обеспечивает движение медузы. Характерно при этом, что в областистатоциста формируются группы нейронов, которым присуща эндогенная ритмическая активность, и которые действуют, следовательно, как пейсмекеры (водители ритма).

У иглокожих радиальная нервная система достигает высокой степени совершенства. И в соответствии с более сложно организованной нервной системой поведение становится более разнообразным. Самое важное событие в структуре нервной системы этой группы животных – появление промежуточных, ассоциативных нейронов. В отличие от ки-

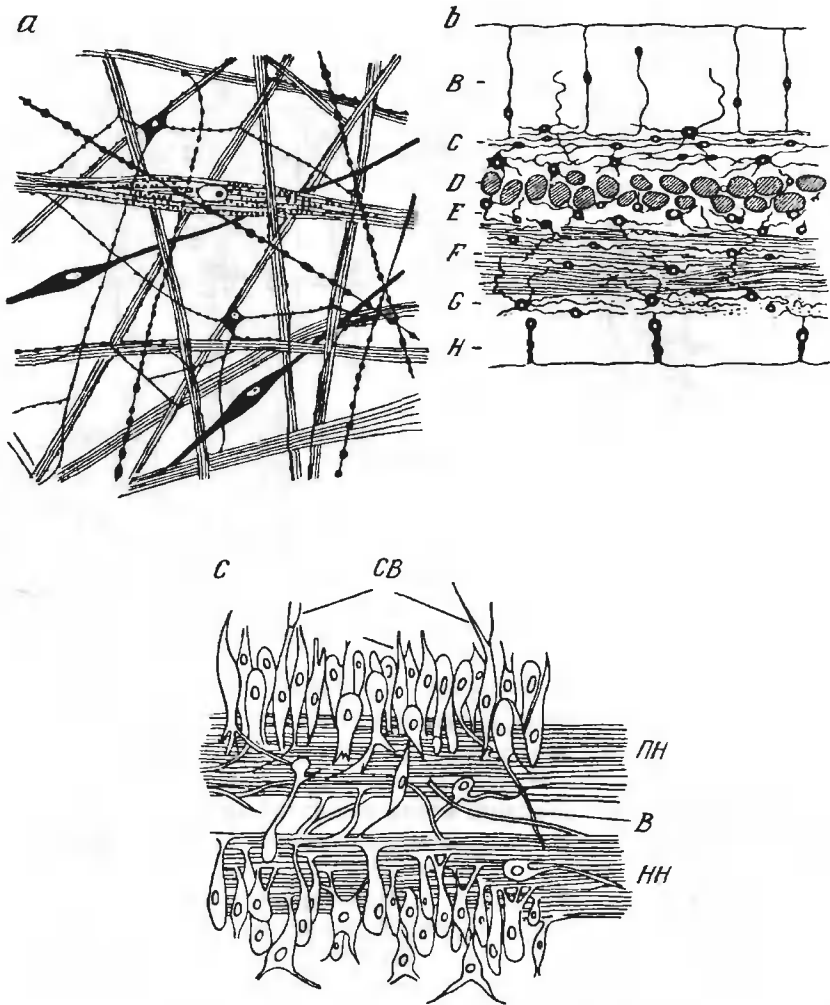


Рис. 2.4. Простейшие нервной системы.

a – эктодермальное нервное сплетение у *Rhizostoma* с малыми и большими биполярными и большими мультиполярными ганглиозными клетками. По Боцлеру. *b* – вертикальный срез ротового диска у актиний. По Лейтису. *B* – эктодерма, *C* – слой наружных биполярных и внутренних мультиполярных ганглиозных клеток, *D* – слой радиальной мускулатуры, *E* – слой ганглиозных клеток мезоглеи, *F* – слой циркулярной мускулатуры, *G* – слой ганглиозных клеток эктодермы, *H* – эктодерма. *c* – тонкая структура нервного кольца медузы *Gonionetis*. По Химану. (*B* – волокна, идущие к нижнему нерву (*НН*), *ПН* – верхностный нерв, *СВ* – соединительные волокна к субумбреллярной сети).

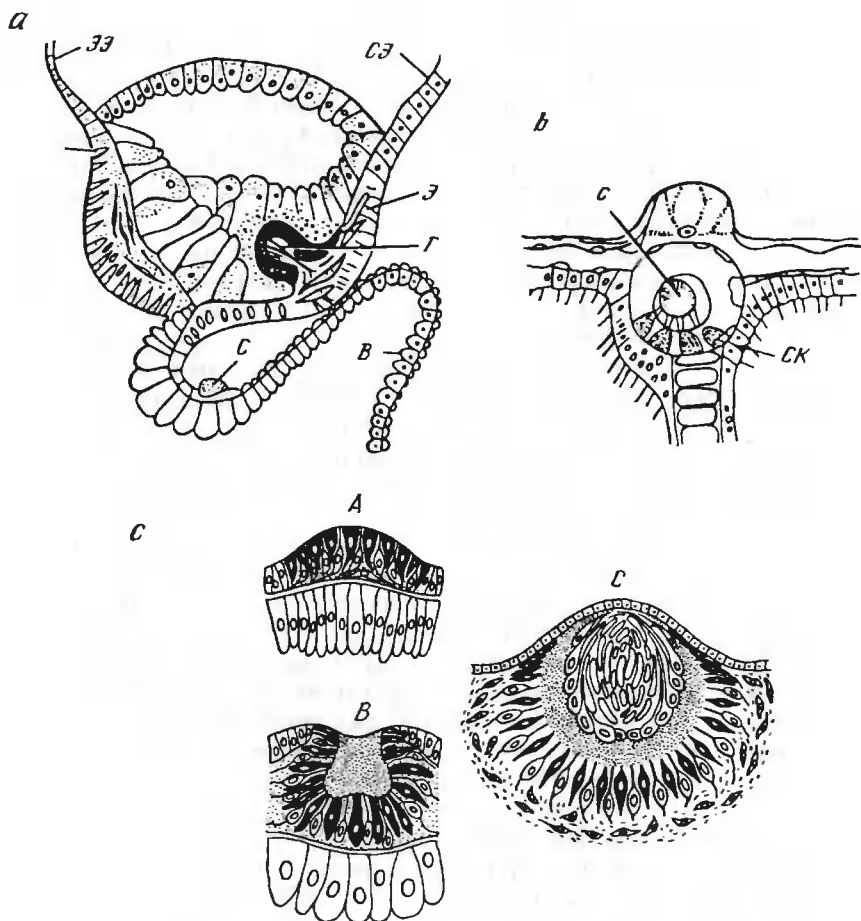


Рис. 2.5. Простейшие рецепторные органы.

a – сложный глазок медузы. По Химану (*B* – вельюм, *Г* – пигментный бокал глазка, *С* – стаатоцист, *СЭ* – субумбреллярный эпидермис, *Э* – чувствительный эпителий, *ЭЭ* – эксумбреллярный эпидермис).

b – закрытый тип стаатоцнста у медузы *Obelia*. По Химану. (*С* – стаатоцит, *СК* – сенсорная клетка).

c – глаза медуз (*A* – *Catablema eurystoma*. По Линко; *B* – *Sarsia mirabilis*. По Линко; *С* – *Charitbdaea marsupialis*. По Шевякову).

щечнополостных, где рецепторные клетки напрямую связываются с эффекторными, здесь эта связь осуществляется при посредничестве ассоциативных нейронов. Таким образом, возрастает разнообразие связей между сенсорными (афферентными) и моторными (эфферентными) нейронами, а образование большего количества синапсов и коллатеральных путей существенно увеличивает возможности нервной системы. Усложняется и поведение: многие морские звезды и морские ежи демонстрируют насиживание яиц, многие виды роют норы.

С развитием **билатерального** плана строения тела большинство животных приобрело продольную ось и ясно выраженные передний и задний полюсы тела. С этого этапа начался новый цикл развития нервной системы, обладающей огромными возможностями к осуществлению самых разнообразных поведенческих реакций. Особенно существенное значение имела **централизация** контролирующего механизма, так что передний конец тела приобретал все больший и больший контроль, в то время как другие центры подчинялись ему или исчезали совсем. У животных с примитивной нервной системой отдельные части тела ведут себя в значительной степени независимо друг от друга, в то время как у животных с заметной централизацией нервной системы действия частей подчинены действиям целого организма.

В нервной сети нейроны с отростками распределены более или менее равномерно в пространстве. В ходе эволюции пучки нервных волокон стали удлиняться, укрупняться и использоваться преимущественно как проводящие элементы, передающими возбуждение быстрее, чем нервная сеть, в то время как клеточные тела объединялись в локальные группы – **ганглии**.

Наивысшая скорость проведения нервных импульсов была достигнута благодаря возникновению гигантских волокон, которые проводят быстрее вследствие их большого диаметра и незначительного количества синаптических связей, а следовательно, благодаря меньшему количеству препятствий на пути импульса по сравнению с обычным нервным волокном. Эти характерные черты центральной нервной системы были найдены у аннелид, моллюсков, членистоногих, у которых они используются в защитных реакциях, таких, как, например, энергичное отбрасывание собственного хвоста омарами. В связи с этими тенденциями развития центральная нервная система в процессе эволюции глубже погружалась внутрь тела, где она была защищена различными опорными тканями. В таких относительно глубоких местах она стала центром, к которому стекаются волокна от различных частей тела.

Так, у плоских червей планарий нейроны в отличие от гидры не разбросаны равномерно по всему телу, а **собираются в группы и концентрируются в головном конце**. Соответственно у этих животных хорошо выражено чувство направления, перемещения вперед и назад, чего нет у гидры. В головном конце у них сосредоточены органы чувств, в том числе светочувствительные глазные ямки. У планарий есть форма поведения, которая, возможно, в процессе эволюции послужила **одной из основ формирования различных форм обучения**. Суть ее заключается в следующем. Если слегка прижать планарию стеклянной палочкой, она свертывается в шарик – это реакция на угрожающую ситуацию. Через несколько минут она начинает осторожно разворачиваться. Если до нее дотронуться снова, она снова свернется, а потом опять распрямится. Но если прикосновения повторять достаточно часто, реакция постепенно ослабевает, пока планария не перестанет сворачиваться, она как бы привыкает к раздражению и уже не считает его опасным. Такое явление называется **привыканием**, или **габитуацией**. Со временем способ-

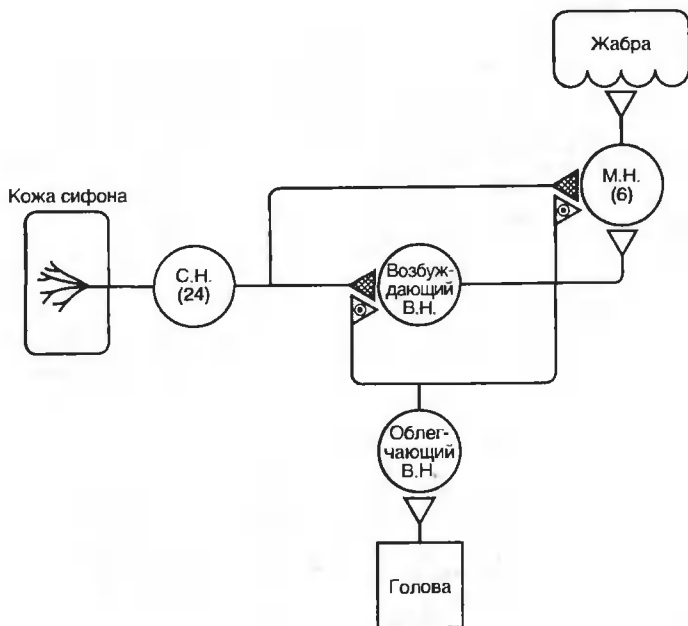


Рис. 2.6. Сенситизация является такой формой обучения и памяти, при которой ответ на стимул усиливается под влиянием другого, более сильного стимула. Здесь рефлекс втягивания жабры у аплзии усиливается в результате ноцицептивного раздражения области головы. Этот стимул активирует нейроны, которые возбуждают облегчающие вставочные нейроны (В.Н.), последние оканчиваются на синаптических окончаниях сенсорных нейронов. Эти нейроны пластичны, т.е. способны изменять эффективность своего синапса. Медиатор облегчающих вставочных нейронов, предположительно серотонин (точки в кружках), модулирует выделение медиатора сенсорного нейрона на возбуждающие вставочные нейроны и мотонейроны.

ность реагировать на прикосновение восстанавливается, и это называется дегабитуацией (снятием привыкания).

У планарий регистрируется и другая форма кратковременного научения – **сенситизация**, противоположная привыканию. Это – усиление ответа на слабый специфический стимул, когда он сочетается с неприятным воздействием, например, с электрическим ударом. Если на планарию воздействовать слабой стружкой воды, она на это никак не реагирует. Но если постоянно сочетать такое воздействие с электрическим ударом, то со временем животное начнет реагировать на стимул, который прежде не замечала. Сенситизация – генерализованный процесс, так как повышается чувствительность не только к стружке воды, но и к множеству других слабых раздражителей (рис. 2.6).

В ходе эволюции червей строение их нервной системы усложнялось в направлении дальнейшей централизации.

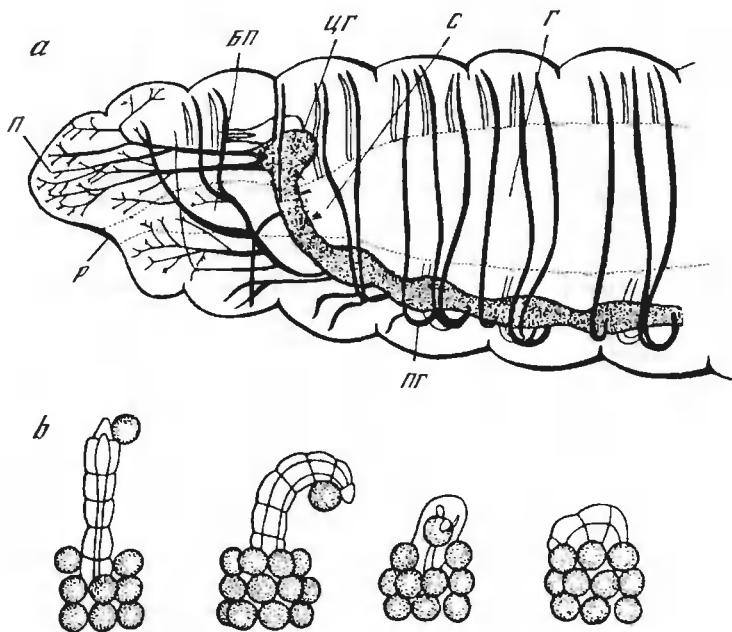


Рис. 2.7. Нервная система дождевого червя и поведение.

a – передняя часть нервной системы земляного червя (*Lumbricus terrestris*). По Hess, 1925 (БП – буккальная полость, Г – глотка, П – простомий, ПГ – подпищеводный ганглий, Р – рот, С – стоматогастрическая нервная система, ЦГ – церебральный ганглий). *b* – постройка трубки червем *Aulophorus carteri*, использующим споры водного растения. По Grasse, 1959.

На рис. 2.7 в качестве примера представлена организация нервной системы земляного червя. Как видно наиболее сильное развитие произошло в переднедорзальной области, где сформировался достаточно мощный надглоточный, или **церебральный**, ганглий, ниже развиваются подглоточный и подпищеводные ганглии.

Усложнение организации нервной системы сопровождалось усложнением поведенческих реакций: они стали проявляться не только в локомоции и пищевом поведении, но также в характерных поструральных рефлексах (например, положение, принимаемое дождевыми червями во время копуляции), в перенесении листьев в норы дождевыми червями. При этом черви всегда захватывают листья таким образом, чтобы обеспечить наименьшее сопротивление при вхождении в нору. Многие водяные черви строят весьма совершенные норы, в которых они живут, используя споры водного растения (рис. 2.7. *b*).

У многощетинковых червей **надглоточный ганглий является тормозным центром**, **подглоточный – моторным**. Без первого морской червь *Nereis* не питается и не роет норы, становится гиперактивным и менее чувствительным к свету и химическим веществам, без второго он инактивен. Развитие разнообразных поведенческих актов обеспечива-

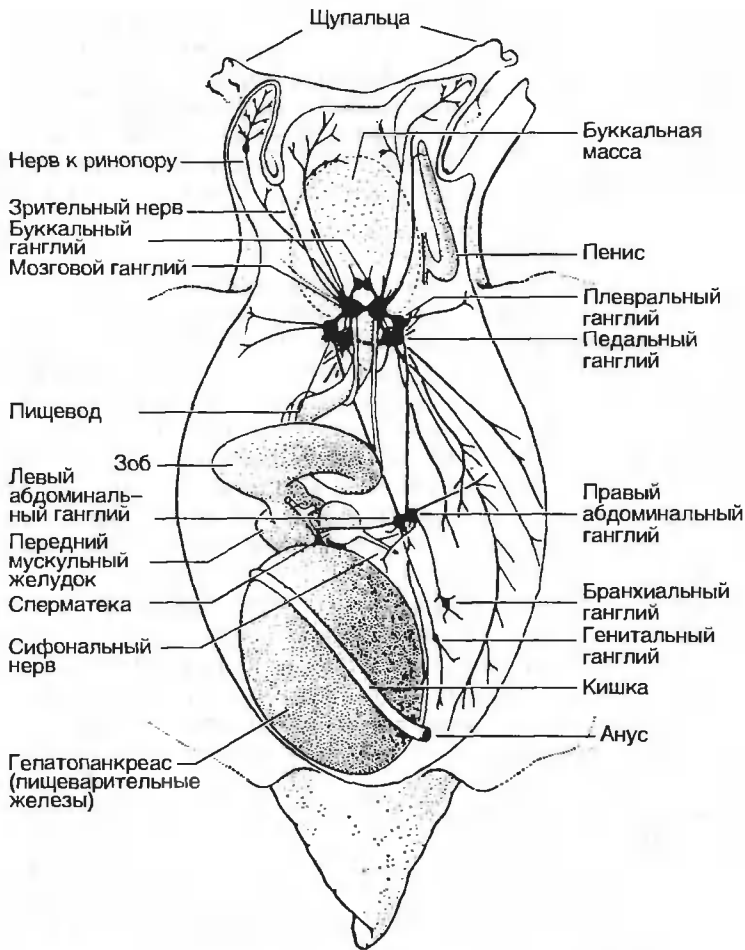


Рис. 2.8. Нервная система брюхоногого моллюска морского зайца (*Aplysia*) и ее связи с разными органами. По Kandel, 1976.

ется соответствующей структурой нервной системы, в которой ганглии развиваются как моторные релейные станции. В качестве примера можно привести педальный ганглий морского черенка. Анальная и генитальная области также являются местами образования ганглиев.

У ракообразных четко прослеживается тенденция к дифференцировке рецепторов. Главными среди специализированных органов чувств являются сложные глаза, расположенные на подвижных стебельках, антенны, несущие хеморецепторы, истатоцисты. Имеются несколько типов механорецепторов, реагирующих на механические раздражения и участвующие в управлении движениями членистых конечностей (рецепторы связок, рецепторы растяжения). Центральная нерв-

ная система характеризуется небольшим количеством клеток (около 100 000 у речного рака), однако ганглии достаточно сложно организованы и имеют промежуточные нейроны, которые способны выполнять функции целых трактов позвоночных. Большинство поведенческих реакций может быть объяснено рефлексорными механизмами. Например, убирание глазного стебелька, открывание и закрывание клешни, бегство, защита, питание, копуляция. Хищные виды способны подкрадываться и нападать из засады на добычу, поведение ухаживания также бывает достаточно сложным.

Наиболее ярко расположение ганглиев в жизненно важных пунктах организма выражено у моллюсков, которые имеют церебральный, pedalный и висцеральный парные ганглии (рис. 2.8).

У брюхоного моллюска *Aplysia* центральная нервная система состоит из нескольких ганглиев, содержащих не более 20 тысяч нейронов, при этом у брюхоногих моллюсков (улитки и др.) надглоточный (церебральный) ганглий стал контролирующим центром активности животного, обеспечивающим способности к осуществлению достаточно сложных форм поведения (реакция ухаживания, обучение в Т-образном лабиринте, привязанность к гнезду и “знание” топографических отношений).

Из моллюсков выделяется выраженной специализацией в развитии ЦНС осьминог. Соответственно и поведение его характеризуется достаточно высоким уровнем совершенства, при этом наблюдается четко выраженная локализация функций. Так, осьминог с оставленными у него только подглоточными долями (рис. 2.9, А) подобен позвоночному, у которого функционирует только спинной мозг (так называемое спинальное позвоночное), он способен лишь к простым рефлексорным движениям. Если низшие моторные центры сохраняют связи с сенсорными долями (в частности, с оптическими), но изолируются от остального мозга (рис. 2.9, Б), то животное принимает ригидную позу наподобие децеребрированного позвоночного. При наличии низших центров, оптических и половины надпищеводных долей (рис. 2.9, В) осьминог может двигаться, но только по кругу.

В пределах надпищеводной области мозга базальные доли – высшие моторные центры, подобные среднему мозгу позвоночных. Они вызывают наиболее сложные и комбинированные движения животного. Лежащие над ними пять центров связаны с еще более сложными особенностями поведения и с обучением. Один из них (вертикальный) считается даже аналогом мозговой коры млекопитающих. При удалении вертикальной доли животное теряет способность к выполнению тех задач, которым оно было ранее обучено, так что она, очевидно, является частью системы памяти.

Наиболее высокого уровня развития среди беспозвоночных структура нервной системы и соответственно поведение достигают у **насекомых**, особенно у перепончатокрылых (Нумепортега). к каковым относятся муравьи, пчелы, осы. Централизация выражена у них весьма заметно, и церебральные ганглии еще сильнее сливаются друг с другом. В мозге можно выделить ряд отделов: протоцеребрум, получающий вхо-

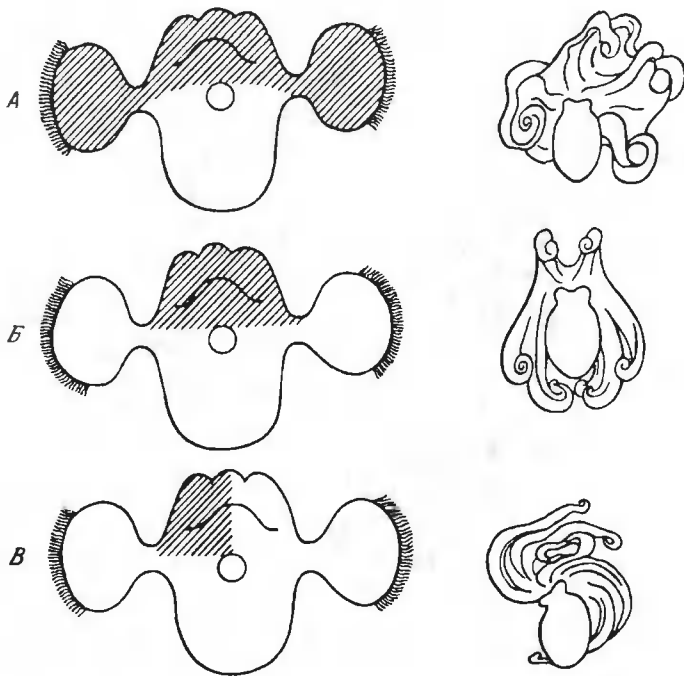


Рис. 2.9. Схема, иллюстрирующая влияние удаления различных частей мозга на позу и движения осьминога. По Boycott, Young, 1950.

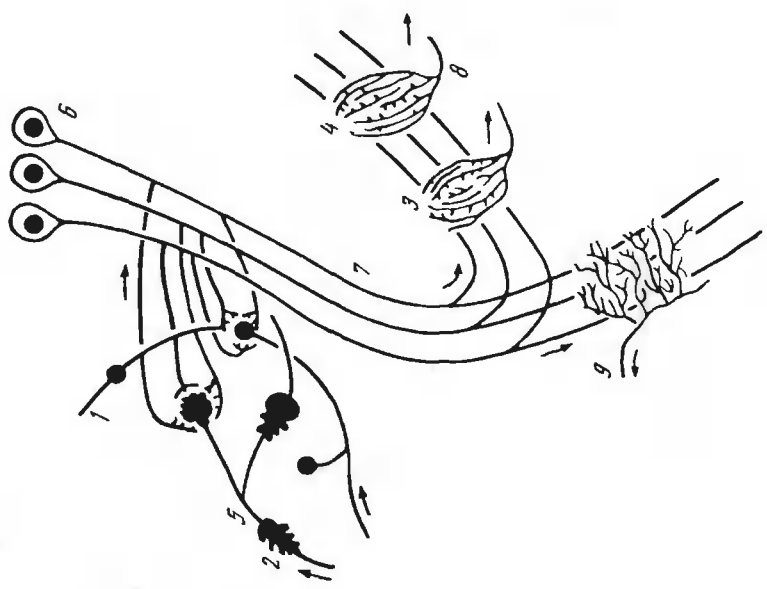
А – полное удаление надпищеводных долей (нарушение позы), *Б* – полное удаление надпищеводных долей при сохранении интактных зрительно-подпищеводных связей (рефлексы положения сохранены, животное не может двигаться); *В* – перерезка зрительных трактов и удаление половины надпищеводных ганглиев (животное может двигаться только по кругу).

ды от глаз, дейтоцеребрум, получающий вход от антенн, и тритоцеребрум, который иннервирует переднюю часть пищеварительного канала и область головы.

На гистологическом срезе мозга выявляется сложная внутренняя структура – различные группы тел нейронов, нейропилы и пучки волокон.

Главным координирующим центром является **протоцеребрум**, который состоит в основном из ассоциативных и чувствительных нейронов. В его состав входят большие оптические доли. В области оптических долей обнаружены три синаптических переключения, через которые осуществляется приток сенсорной информации от глаз в нервные центры. В протоцеребруме имеется несколько ассоциативных центров, среди которых выделяются **грибовидные тела** (см. рис. 2.10). Они представляют собой парные, билатерально симметричные образования, состоящие из расширенной чашечки и ножки (или стебелька). На внутренней и наружной поверхности чашечек сосредоточено множество

b



a

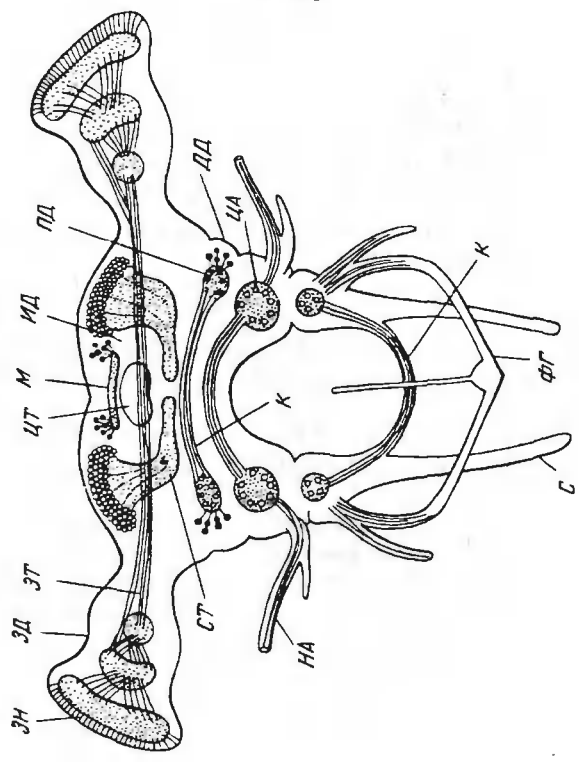
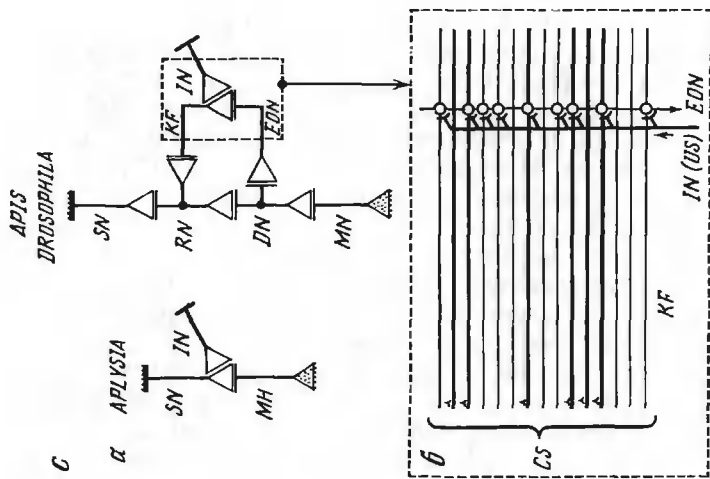


Рис. 2.10. Мозг насекомых.

a – схематическое изображение главных частей мозга насекомого и основных проводящих путей. По Snodgrass, 1935 (*ДД* – добавочная доля, *ЗД* – зрительная доля, *ЗН* – зрительный нерв, *ЗТ* – зрительный тракт, *ИД* – интрацеребральная доля, *К* – комиссуры, *М* – мост, *НА* – нерв антенны, *ПД* – протоцеребральная доля, *С* – связи, окружающие пищевод, идущие к подпищеводному ганглию, *СТ* – стебельчатое, или грибовидное, тело, *ФГ* – фронтальный ганглий, *ЦА* – центр антенны, *ЦТ* – центральное тело).

b – схема соединения внутреннего глобулярного нейрона с наружными элементами в грибовидном теле сверчка *Acheta domestica*. По Schmittner, 1974 (1, 2 – кнопки различных внешних элементов, которые связаны с внутренними дендритами чашечки; 3, 4 – постсинаптические внешние волокна, 5 – чашечка, 6 – тела глобулярных клеток, 7 – ножка грибовидного тела, 8 – альфа-доля, 9 – бета-доля).

c – модель долговременной памяти, опосредованной структурной пластичностью грибовидных тел (*a* – минимальный контур ольфакторного пути, в котором наблюдается классическое обуславливание и модуляция количества волокон; для сравнения показан минимальный контур для жабрного рефлекса избегания у аплизии, в основе которого лежит каскад с участием циклического аденозинмонофосфата, о чем пойдет речь в главе о молекулярно-генетических основах памяти; *SN* – сенсорный нейрон, *RN* – релейный нейрон, *KF* – волокно клетки Кеньона, *IN* – интернейрон, *EON* – внешний нейрон выхола, *DN* – нисходящий нейрон, *MN* – мотонейрон. Известно, что все элементы этого контура присутствуют и у дрозофилы, за исключением прямой связи между *EON* и *DN*. Замечто, что в модели аплизии безусловный стимул действует прямо на синапсы между сенсорным и моторным нейронами, в то время как у насекомых модуляция касается “бокового пути” (side pathway). *б* – модель, предполагающая, что в течение импгинальной жизни некоторые *KF* разрушаются и замещаются. Они формируют временные синапсы с *EON*, их пресинаптические терминалы по очереди контактировали с модулирующими интернейронами. Совпадающее возбуждение *KF* и *IN* ведет к модификации и консолидации синапсов между *KF* и *EON*. Качество синапсов детерминирует длительность переживания соответствующих *KF* и, следовательно, модулирует уровень стабильного состояния нервных волокон в грибовидных телах. *CS* – условный стимул, т.е. паттерн возбуждения определенных волокон кельюновских клеток, соответствующий, например определенному запаху. *US* – безусловный стимул, например нейтральная активность соответствующая вкусу сахара, электрошоку или чему-то подобному).



униполярных интернейронов. Отростки этих нейронов ветвятся: одна ветвь посылает волокна в ножку и раздваивается, направляясь к дистальным частям альфа- и бета-долей, другая посылает волокна в нейротильные чашечки. Нейроны чашечки имеют входы от различных областей мозга (оптических и антеннальных долей), и они являются источником тормозящих влияний. Выжигание этих нейронов термокаутером вызывает значительное повышение двигательной активности, а их локальное раздражение электрическим током затормаживает локомоторные акты. Альфа- и бета-доли являются источником премоторного выхода. Наибольшее число синаптических контактов сосредоточено в нейротиле чашечки и в дистальных частях альфа- и бета-долей. Именно грибовидные тела выполняют интегративные функции и играют важную роль в процессах обучения и памяти. Имеется корреляция между сложностью поведения насекомых и степенью развития грибовидных тел. Например, у муравьев объем грибовидных тел у рабочих особей, самок и самцов относится как 8:4:1 соответственно. У дрозофилы каждое из парных грибовидных тел содержит 2500 параллельных волокон, образованных так называемыми клетками Кеньона, происшедшими в онтогенезе из четырех нейробластов.

В средней части протоцеребрума расположен комплекс под названием **центральное тело**. Центральное тело, регулируя возбудимость моторных центров, участвует в контроле ритмов циркадной активности, а также в контроле мышечного тонуса. После выжигания нейронов центрального тела термокаутером все локомоторные акты подавляются. Напротив, локальное раздражение центрального тела электрическим током у сверчков и саранчовых активизирует ходьбу, прыжки и полет. С функционированием центрального тела связано состояние катаlepsии и акинеза у насекомых, когда они прижимают ноги к телу и сваливаются с растения на землю, притворяясь мертвыми.

В целом поведение насекомого регулируется на основе сбалансированного соотношения сигналов, поступающих в грудные ганглии от центрального тела (возбуждающие сигналы) и от шляпки грибовидных тел (тормозящие сигналы).

В протоцеребруме локализованы и нейросекреторные клетки, вырабатывающие нейрогормоны, которые управляют метаболическими реакциями, регулируя протекание линек, метаморфоза и диапаузы у насекомых.

Подглоточный ганглий возбуждает двигательную активность, но сам тормозится со стороны протоцеребрума. После удаления головного мозга подвижность насекомого возрастает, потому что снимается заторможенное состояние как грудных ганглиев, так и возбуждающей субстанции подглоточного ганглия. Еще один источник возбуждающих влияний, контролирующих ритмическую активность мышц, обнаружен также в тритоцеребрум.

Поведение насекомых в соответствии с законом параллельных рядов А.А. Заварзина во многом напоминает поведение млекопитающих, способности к обучению достигают у них высокого уровня, у высших форм насекомых отмечается определенная пластичность поведения.

Эти особенности поведения обусловлены эволюционными изменениями организации животного:

1. Наличие сложных органов чувств, позволяющих осуществлять высокодифференцированную оценку окружающей среды.

2. Развитие сочлененных придатков (суставных соединений) с их преобразованием в ноги и органы рта, что сделало возможной высокую способность к разного рода манипуляциям.

3. Развитие мозга, достаточно сложного, обладающего необходимой интегративной способностью для организации огромного потока сенсорной информации и управления движениями придатков.

У насекомых хорошо развиты визуальная, обонятельная и тактильная чувствительность. Зрительное восприятие у этих беспозвоночных развито лучше, чем у дятла, что имеет большое адаптивное значение в связи со скоростью полета у многих насекомых. Точно так же и острота обоняния соперничает с таковой у позвоночных. В силу развитости этих систем насекомые способны манипулировать предметами внешней среды и поддерживать сложные отношения между собой. Они строят весьма искусные гнезда, роющие пчелы и осы выкапывают подземные гнезда и доставляют туда парализованную добычу в качестве пищи для молодняка. Осы, сооружающие гнезда из бумаги, воздвигают их из видоизмененных древесных волокон, медовые пчелы строят ювелирно точные восковые соты. Тропические муравьи, строят гнезда из листьев, связываемых при помощи шелковых нитей. Сами муравьи не могут прыгать, это делают их личинки. Взрослые держат личинки в своих челюстях и используют их в качестве челнока. Общественные насекомые, в частности, муравьи имеют морфологически различные касты, каждой из которых свойствен характерный тип поведения. При этом все особи могут принадлежать к одному и тому же генотипу.

Известны случаи своеобразной активности специализированных каст. Например, охота, оборона колонии, захват и превращение в рабов особей других видов, культивирование “грибных садов”, использование тлей в качестве “коров” (сахаристые выделения этих животных очень любят муравьи и в буквальном смысле слова доят их).

Бурые муравьи копают дороги, которые они покрывают сводом из выброшенной сырой земли. В очень открытых местах, они пробивают туннели, которые затем опять переходят в крытые дороги. Когда путь проходит в защищенном месте, муравьи не делают свода. Крытые пути служат для сообщения между гнездами одной колонии, а также ведут к растениям, покрытым травяными тлями. Вдоль стебля растения муравьи устраивают крытые земляные галереи, замуровывающие тлей.

Еще в 1913 г. Фриш установил возможность выработки условных рефлексов у пчел. Он располагал на нескольких квадратах, окрашенных в серый цвет, чашечки с водой, а на синем квадрате – чашечку с сиропом. После ряда прилетов пчел чашечку с сиропом убирала, однако пчелы продолжали прилетать на синий квадрат, руководствуясь только его цветом. Фриш обнаружил также, что пчелы способны дифференцировать цвет и геометрическую форму подставки, которые выступали в роли условных раздражителей. У пчел и муравьев открыт даже своеобраз-

разный “язык”, когда эти животные с помощью специфических движений передают друг другу необходимую информацию. “рассказывая”, например, о том, как найти дорогу к цветам для сбора нектара (так называемый “танец пчел”, открытый Фришем). Естественно, что такие сложные формы поведения, действительно напоминающие поведение млекопитающих, могли осуществиться только при наличии соответственно высокого уровня развития нервной системы. Этот уровень обеспечивается главным образом сложностью формирующихся в процессе онтогенеза межнейронных связей, ибо количество нервных клеток в мозге насекомых невелико: 950 тыс. в мозге пчелы и всего лишь 20 тыс. – в мозге дрозофилы, также характеризующейся весьма развитыми формами поведения и выраженной способностью к обучению.

И, наконец, у **позвоночных** мы находим новую специализацию в эволюционном развитии нервной системы. Они обладают единым дорзальным нервным тяжем, оканчивающимся впереди большой ганглиозной массой – **головным мозгом**.

Головной мозг делится на три основные области – передний, средний и задний мозг, появляющиеся в раннем эмбриогенезе всех позвоночных в виде трех первичных мозговых пузырей на переднем конце нервной трубки.

При этом бросается в глаза параллелизм в организации мозга позвоночных и насекомых. Так, у насекомых каждый из трех церебральных ганглиев имеет свой главный сенсорный вход – соответственно от антенн, глаз и кишечника. У позвоночных передний мозг получает сигналы от органов обоняния, средний мозг – от органов зрения, а к заднему мозгу идут сигналы от некоторых органов чувств (ухо, органы равновесия), а также от внутренних органов, включая кишечник.

Соматические входы, поступающие к спинному мозгу, направляются от него вперед ко всем трем частям головного мозга. Изменения мозга позвоночных в процессе эволюции от простых форм (А) к сложным (Б) представлены на рис. 2.11. На рисунке видны две особенности основного строения мозга позвоночных. Первая связана с тектумом крыши среднего мозга. Входы тектума представлены волокнами зрительного нерва. Клетки тектума в свою очередь посредством прямых связей или связей с переключениями дают проекции в спинной мозг, обеспечивая управление мышцами. Эти волокна образуют текто-спинальный тракт. Показаны также сенсорные волокна, идущие от тела и входящие в спинной мозг через дорзальные корешки, а затем направляющиеся вверх через одно или несколько переключений к центрам среднего мозга. Тем самым подтверждается, что средний мозг является ключевым центром, где происходит интеграция сенсорных входов и управление моторными входами. В обонятельную луковицу, как показано на схеме, поступают входы от рецепторов носа. Выходные волокна через переключения идут в конечный мозг и назад в гипоталамус. Предполагается, что в процессе эволюции позвоночных конечный мозг возник в тесной связи с обонятельной системой. У некоторых видов позвоночных обонятельная система настолько доминирует над конечным мозгом, что может рассматриваться как обонятельный мозг.

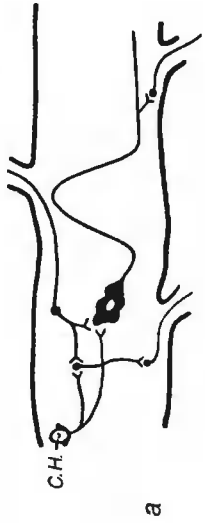
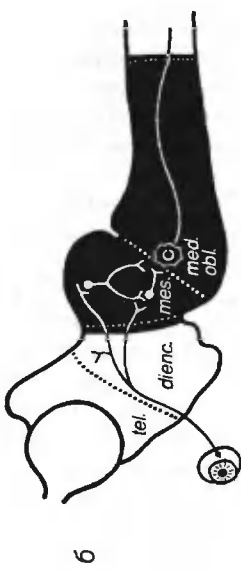
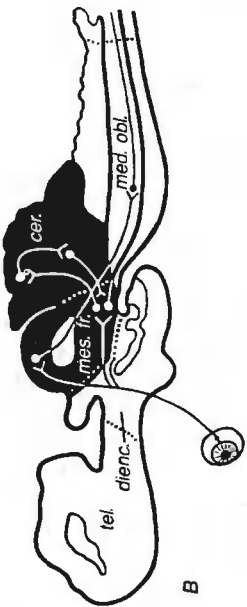
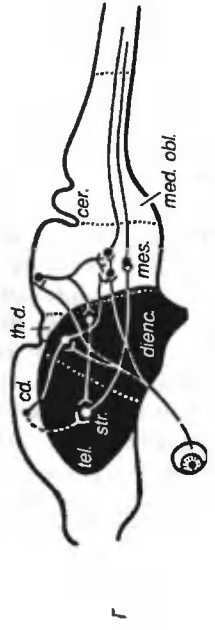
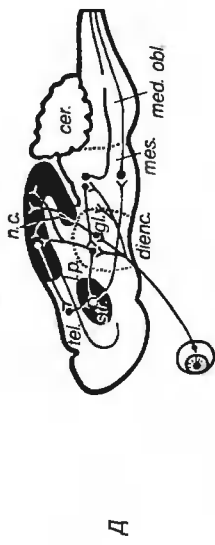
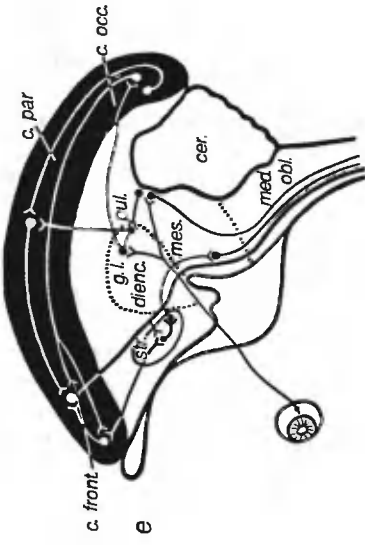
Головной мозг эволюционировал так, что над задним мозгом развился **мозжечок**, осуществляющий сложную сенсомоторную координацию, так что задний мозг разделился на **варолиев мост** (практически часть мозжечка) и **продолговатый мозг**. В среднем мозге тектум специализировался для более сложной переработки зрительной и слуховой информации. В переднем мозге претерпел интенсивное развитие внешний покрывающий слой (плащ, называемый также **корой головного мозга**), который вместе с несколькими связанными с ним внутренними структурами – подкорковыми, так называемыми **базальными ганглиями** – образует полушария **большого мозга**. При этом следует особо отметить развитие **гиппокампа** (*hippocampus* – по латыни морской конек, что объясняется сходством с изогнутым хвостом этой рыбки), который играет важную роль в процессах обучения и памяти. Это парное образование, часть старой коры большого мозга, которая намечается уже у амфибий, а у рептилий вполне развита и четко отделена от подкорковых структур. Является центральной частью лимбической системы, управляющей эмоциональной жизнью, участвует в организации ориентировочного рефлекса и внимания, регистрирует новую информацию, приходящую в мозг, участвует в управлении произвольными движениями, в механизмах памяти и обучения, в формировании сложных форм поведения, особенно связанных с необходимостью активного торможения.

У птиц и млекопитающих развитие большого мозга связано с поступлением зрительной, слуховой и сенсомоторной входной информации, а также с усложнением ее переработки и осуществлением сложных движений.

Следует отметить своеобразие эволюции мозга птиц, развивающегося по пути усложнения подкорковых ядер, в особенности так называемого *Corpus striatum*, а не формирования корковых структур. Эта структура достигает у птиц наивысшего совершенства и, по-видимому, принимает на себя множество тех функций, которые у млекопитающих выполняет кора головного мозга. По всей вероятности, именно это обстоятельство отражается на особенностях поведения птиц, которое также достаточно сложно, так что некоторые виды этих животных способны даже считать до 10.

Дифференцировка **промежуточного мозга** способствует выполнению двух важных функций – переключения информации на ее пути между полушариями и остальными отделами головного мозга и управления **гипофизом**, железой, регулирующей эндокринную систему организма. На рисунке видно, что, несмотря на модификацию каждой из частей центральной нервной системы в процессе эволюции, остается отчетливо различимой **исходная цепь структур**, которая, кстати, обнаруживает поразительное сходство с соответствующей цепью структур у насекомых.

Многие виды птиц способны воспроизводить человеческую речь. При этом отмечается три типа говорения. Первый тип – **бесситуационное говорение**, когда птица просто воспроизводит некую последовательность слов безотносительно к ситуации. Следующая форма птичь-



ей “речи” – **ситуационное говорение**, когда птица не просто воспроизводит заученное, а связывает слова с определенной ситуацией. Например, волнистый попугайчик, проголодавшись, кричит: “Хочу есть!” Наконец, самым сложным типом говорения является **ассоциативно-понятийное говорение**, которое предполагает умение вступать в диалог с человеком.

Следует в то же время отметить, что элементы сетевого строения нервной системы сохранялись в ходе эволюции и у высокоорганизованных животных, выполняя определенные функции, а именно те, которые сетевой организацией могут обеспечиваться наиболее эффективно. Это, например, координация перистальтических движений кишечника позвоночных, которая выполняется интрамуральным нервным аппаратом, построенными по типу нервных сетей, ауэрбаховским и мейснеровским сплетениями.

Эти элементы, однако, несмотря на известную автономию в их функционировании, контролируются вышестоящими отделами нервной системы и включены как часть в общую интегративную систему организма.

В целом развитие мозга позвоночных проходит ряд этапов. На самом раннем из них, у бесчерепных (ланцетник) наблюдается отсутствие специализации в ЦНС (см. рис. 2.11), поэтому у них могут быть выполнены лишь простейшие условнорефлекторные реакции. На следующем этапе развития – у пластинчатожабренных рыб (скатов и акул) таламические структуры (центры, собирающие афферентную информацию из различных пунктов организма) и теленцефалические образования (структуры конечного мозга) еще недостаточно развиты в морфофункциональном отношении. В связи с этим простые и более сложные условнорефлекторные реакции хотя и развиваются, но медленно и они непрочны.

У рептилий, особенно у черепах, в конечном мозге уже вычленяется древняя, старая и новая кора (архи-, палео- и неокортекс), усложняется Striatum, намечается примитивный неокортекс. Соответственно поведение значительно усложняется по сравнению с низшими позвоночными, однако по сравнению с млекопитающими оно еще в значитель-

Рис. 2.11. Этапы развития уровней интеграции в филогенезе позвоночных. По Карамян, 1976.

a – бесчерепные (ланцетник), спинальный уровень интеграции (в центре – гигантская клетка Родэ с аксоном, обеспечивающим нисходящие связи); *б* – круглоротые (минога), бульбомезенцефальный уровень интеграции; *в* – пластинчатожабренные рыбы (акула), мезенцефалодорцебеллярный уровень интеграции; *г* – рептилии (черепаха), диэнцефалотеленцефальный уровень интеграции; *д* – насекомоядные (еж), стриокортикальный уровень интеграции; *е* – приматы (обезьяна), неокортикальный уровень интеграции.

cd – cortex dorsalis, *cer* – cerebellum, С.Н. – глазок Гекса, *c. front* – cortex frontalis, *c. occ.* – cortex occipitalis, *c. par.* – cortex parietalis, *diens* – diencephalon, *fr* – formato reticularis, *g.l.* – n. geniculatus lateralis, *l.p.* – n. lateralis posterior, *med.obl.* – medulla oblongata, *mes* – mesencephalon, *n.c.* – neocortex, *pul* – pulvinar, *str.* – striatum, *tel.* – telencephalon, *th.d.* – thalamus dorsalis.

На схеме показаны только зрительные афферентные проекции. Относительные размеры мозга разных животных не соблюдены.

ной степени примитивно и отличается, в частности, отсутствием способности к прогнозированию.

У низших млекопитающих (насекомоядные – ежи) мозг характеризуется увеличением общей поверхности неокортекса и развитием дорзальных ядер зрительного бугра (таламус). В таламических ядрах и неокортексе начинается формирование ассоциативных систем. Вследствие этого у ежей возможно образование более сложной последовательной цепи двигательных поведенческих актов на зрительные задачи. У ежей, однако, слабо развиты ориентировочно-исследовательские реакции и в процессе обучения не используется тактика “проб и ошибок”, свойственная более высокоорганизованным млекопитающим. У низших млекопитающих ведущая роль в организации сложных форм поведения принадлежит Neostriatum, которому присущи некоторые высшие функции мозга, свойственные лобной ассоциативной коре высших млекопитающих. У последних наблюдается дальнейшее развитие неокортекса, особенно лобного отдела. При этом отмечаются ускоренные темпы развития ассоциативной коры, что обеспечивает осуществление самых сложных поведенческих актов.

Таким образом, в процессе эволюции мозга устанавливается строгая корреляция между степенью специализации в структурах ЦНС, свойствами условнорефлекторной деятельности и характеристикой способности к фиксации следов сложных двигательных рефлексов, а также способности к вероятностному прогнозированию, т.е. удержанию в памяти в течение каждого отдельного опыта определенной программы.

По мере развития кортикальных функций и специализации подкорковых и диэнцефальных структур возникает возможность образования более сложных условных рефлексов и осуществления более сложных форм поведения. У высших млекопитающих, характеризующихся наиболее сложными формами поведения, интенсивно развивается ассоциативная таламокортикальная система, и степень участия этих мозговых структур в организации поведения **коррелирует с этапами развития интегративной деятельности мозга.**

Организация нервной системы и поведение. Онтогенетический аспект

В предыдущем разделе мы видели, как в соответствии с усложнением организации нервной системы в филогенезе усложняется поведение животных. Можно предполагать, что в ходе индивидуального развития организмов имеют место те же взаимоотношения формирующейся в онтогенезе нервной системой с соответствующими поведенческими реакциями, за осуществление которых она ответственна (иными словами, как соотносятся структура и функция, преформирована ли в онтогенезе та организация мозга, на основе которой формируется ответ на внешние воздействия).

В 30-е годы Е. Холт (Holt) выдвинул гипотезу, согласно которой ни одна из форм синаптических связей между чувствительными, централь-

ными и двигательными нейронами не предопределена от рождения. Силы, направляющие развитие, оставляют нервную систему в виде неорганизованной, эквипотенциальной сети, способной только на диффузные, случайные реакции. Функциональная организация нервной системы возникает из первоначально случайных движений и постепенно совершенствуется за счет предполагаемого нейробиотактического прорастания дендритов к аксонам, возбужденным в процессе функциональной активности. На основе функциональной нагрузки формируются не только самые примитивные рефлексy и первичные синаптические связи, но все высшие интегративные связи.

Известный исследователь Куо пытался приложить концепцию Холта к развитию нервной системы птиц. Он отрицал наличие врожденных компонентов поведения и спонтанной активности как таковой. Однако взгляды Куо не выдержали экспериментальной проверки. В частности, в опытах Виктора Гамбургера (Hamburger) было установлено, что уже на ранних стадиях эмбриогенеза движения зародыша имеют нейрогенное происхождение. Электрофизиологические исследования показали, что первые движения обуславливаются спонтанными эндогенными процессами в нервных структурах куриного эмбриона. Спустя 3,5–4 дня после появления первых его движений наблюдались первые эксцерецептивные рефлексy. Многие авторы показали также, что тактильная стимуляция не оказывает существенного влияния на частоту и периодичность движений, производимых куриным эмбрионом на протяжении первых 2–2,5 недель инкубации. Согласно Гамбургеру, двигательная активность зародыша на начальных этапах эмбриогенеза самогенерируется в центральной нервной системе. Гамбургер поставил следующий эксперимент: перерезав зачаток спинного мозга в первый же день развития куриного эмбриона, он регистрировал впоследствии (на 7-й день эмбриогенеза) ритмичные движения зачатков передних и задних конечностей. Нормально эти движения протекают синхронно. У оперированных же эмбрионов эта согласованность нарушилась, но сохранилась самостоятельная ритмичность движений. Эти результаты указывают на независимое эндогенное происхождение этих движений, а тем самым и соответствующих нервных импульсов, на автономную активность процессов в отдельных участках спинного мозга. С развитием головного мозга он начинает контролировать эти ритмы. Эти данные свидетельствуют и о том, что двигательная активность не обуславливается исключительно обменом веществ, например, такими факторами, как уровни накопления продуктов обмена веществ или снабжения тканей кислородом, как предполагали некоторые ученые.

Концепция Холта имеет в настоящее время лишь исторический интерес, ибо она не согласуется с результатами многочисленных нейрофизиологических исследований. Одним из наиболее демонстративных опытов, опровергающих точку зрения Холта, является обработка кураре эмбрионов развивающихся животных. В этом случае блокируется функционирование синапсов в дифференцирующейся нервной системе. Несмотря на это, нервная система развивается нормально, в соответ-



Роберт Сперри, выдающийся нейробиолог, лауреат Нобелевской премии. Сформулировал основные принципы развития мозга, доказал детерминистический механизм этого развития.

вни с законами морфогенеза. Более того, если отмыть подопытных особей от кураре, то эти животные оказываются способными к осуществлению всех тех поведенческих актов, которые выполняют в этот период контрольные животные.

Учитывая результаты экспериментов такого рода В. Хантер (W. Hunter) в 40-е годы пришел к заключению, что формирование синаптических связей во всей нер-

вной системе позвоночных животных организуется **внутренними силами развития без помощи обучения**. Иными словами, существует так называемый **дофункциональный период** развития нервной ткани, т.е. нейронные системы дифференцируются до того, как они начали функционировать и независимо от функций, так что в определенный период развития организма формирование структуры предшествует функции. Более того, имеется множество данных о том, что на ранних стадиях формирования мозга образуется огромный избыток синаптических связей, который затем постепенно уменьшается; лишние или вообще ненужные синапсы исчезают, а остальные тем или иным способом стабилизируются. Процесс отмирания и стабилизации синапсов, видимо, служит одним из основных механизмов, с помощью которых опыт изменяет структуру мозга в ходе его формирования.

Весьма демонстративны в этом отношении опыты нобелевского лауреата Роберта Сперри (Sperry). Он поворачивал у амфибий глазное яблоко на 180° вокруг оптической оси, не повреждая зрительного нерва. Глаз приживлялся, но при этом спинной квадрант сетчатки был расположен в обратном направлении по отношению к орбите, а височный — повернут к нему. Соответственно извращались зрительные реакции, и нападение на мелкие движущиеся объекты становилось направлено к соответствующим точкам противоположного квадранта поля зрения по отношению к тому, в котором расположена приманка (рис. 2.12).

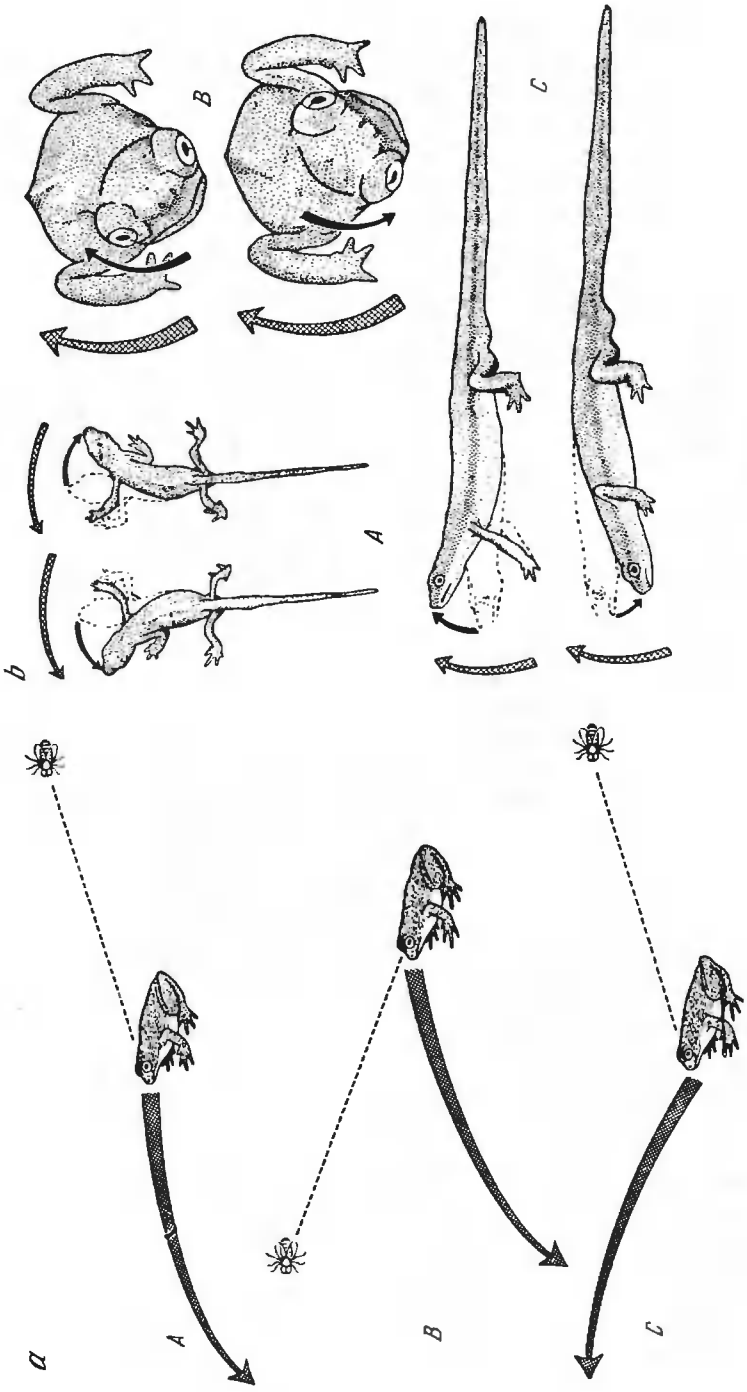
Реакции, характеризующиеся ошибочным приспособлением, сохраняются неограниченно долго без исправления. Есть также убедительные доказательства того, что правильная проекция сетчатки к центрам мозга развивается даже в полной темноте, т.е. процесс обучения не

влияет в данном случае на организацию структуры, передающей эти реакции.

Следовательно, способность к выполнению определенных поведенческих актов и к обучению **преформированы** в структуре нервных сетей, сформировавшейся в ходе индивидуального развития на основе **морфогенетических закономерностей**. Это относится ко всем интегративным структурам спинного мозга и ствола мозга. На более высоких уровнях мозга, даже у приматов, все сложные взаимодействия, известные в нейроанатомии, в частности, различные проекционные системы, идущие к коре больших полушарий и мозжечку и от них, а также системы соединений между отдельными зонами коры головного мозга – в той мере, в какой они постоянны у каждого вида животных – также должны быть отнесены к тем связям нервного аппарата, которые подчиняются врожденной организации.

В то же время функционирование необходимо для, так сказать, созревания развивающихся систем нейральных ансамблей, и **функциональный период** очень важен для их окончательного оформления. Известно, например, что у котят первые три недели жизни до и после открытия глаз составляют **критический период** для развития зрительных проводящих путей. Показано, например, что при содержании котят в этот период в полной темноте их зрительная система должным образом не развивается, котята видят, но не способны координировать свои движения, пользуясь зрением, обходить препятствия или различать глубину. Полная темнота не обязательна, поскольку сходный эффект, хотя и менее выраженный, можно получить, надев на растущего котенка большой бумажный воротник, не позволяющий ему видеть собственное тело. Подобные дефекты поведения обусловлены нарушениями в организации мозговых структур. Если, например, выращивать котят в условиях, где единственным сложным зрительным стимулом будет рисунок из вертикальных белых и черных полос, то зрительная кора приобретает повышенную чувствительность к вертикальным линиям, но практически не реагирует на горизонтальные. Таким образом, под влиянием сенсорного опыта в период развития котят характер связей в их зрительной системе изменяется таким образом, что количество клеток, реагирующих на часто воздействующие стимулы (в данном случае вертикальные полосы) возрастает, а доля клеток, чувствительных к редким стимулам (горизонтальные полосы) уменьшается. Можно, следовательно, говорить, что **функциональный период развития** характеризуется своеобразной способностью зрительной системы к **самоорганизации**, зависимой от активности.

При этом встает вопрос, складываются ли сложные реакции поведения в ходе онтогенеза из более простых, элементарных, или же первичны более “общие” поведенческие акты, а более простые “вычлениются из них”. Первым попытался дать ответ на этот вопрос выдающийся американский анатом Дж. Когхилл (Coghill). В опытах на аксолотле он показал, что прежде всего появляются общие упорядоченные движения сомитов туловища и лишь позднее возникают локальные рефлекс



как специфические элементы более общего механизма интеграции целостного организма.

Когхилл выделил пять физиологических стадий в период развития поведенческих реакций у аксолотля.

1. Стадия неподвижности, когда сокращения мышц вызываются непосредственной стимуляцией (острая игла, механическое или электрическое возбуждение).

2. Стадия ранних изгибов, когда впервые обнаруживается реакция на прикосновение к коже.

3. Стадия петли, характеризующаяся свертыванием в тугую петлю.

4. Стадия "S", на которой начинается обратный изгиб до завершения петли.

5. Достаточное для продвижения выполнение реакции "S" сериями.

Первой ступени свойственна сократимость мышц без нервного воздействия, **второй** – первое нервное возбуждение мышц с осязательного рецепторного поля, **третьей** – полное развитие силы мышц, **четвертой** – первая координация для продвижения, **пятой** – законченное продвижение.

На стадии неподвижности анатомия взаимоотношений сенсорных и двигательных (моторных) элементов такова, что возбуждение не может быть перенесено с сенсорного пути на двигательный, хотя и сенсорные и моторные элементы уже имеются. Мышцы способны сокращаться в ответ на непосредственное их раздражение, но они не отвечают на кожное раздражение, независимо от того, тактильное оно или химическое. Этот ответ появляется только тогда, когда формируется третья группа клеток, которые образуют мост между сенсорной и моторной системой (рис. 2.13, а).

Тела этих клеток лежат на пластинке, составляющей основание продолговатого мозга и верхней части спинного мозга. На стадии неподвижности они однополюсны (униполярны). Когда они становятся двухполюсными, биполярными, они замыкают путь от сенсорного поля к мышцам, причем этот путь ведет к мышцам не раздраженной



Рис. 2.12. Эксперименты Роберта Сперри.

a – типичные примеры ошибок пространственной локализации мелких объектов после поворота и инверсии глаза. По Сперри (*A* – при повороте глаза на 180° лягушка нацеливается на точку в поле зрения, диаметрально противоположную действительному расположению приманки; *B* – после спинно-брюшной инверсии глаза лягушка нацеливается правильно в височно-носовой плоскости поля зрения, но извращенно (в противоположную сторону) в спинно-брюшной плоскости; *C* – после височно-носовой инверсии глаза лягушка нацеливается правильно в спинно-брюшной плоскости зрения, но извращенно (в противоположную сторону) в височно-носовой плоскости).

b – извращение зрительно-двигательных реакций после хирургической перестройки связей между сетчаткой и центрами мозга. По Сперри. В трех основных проекциях показана нормальная поисковая фаза реакции вместе с извращенными поисковыми реакциями, вызванными: 1) поворотом глаз на 180° , 2) спинно-брюшной инверсией, 3) височно-носовой инверсией. 4) перекрестным соединением зрительных нервов. Большие стрелки указывают действительное направление движения поля зрения. Извращение вызвано: в *A* – 1, 3, 4, в *B* – 1, 2, 4, в *C* – 2, 3. Более сложные корреляции достигаются при повороте глаз на 90° и при сочетаниях поворота глаза, его инверсии и перекрестного соединения зрительных нервов.

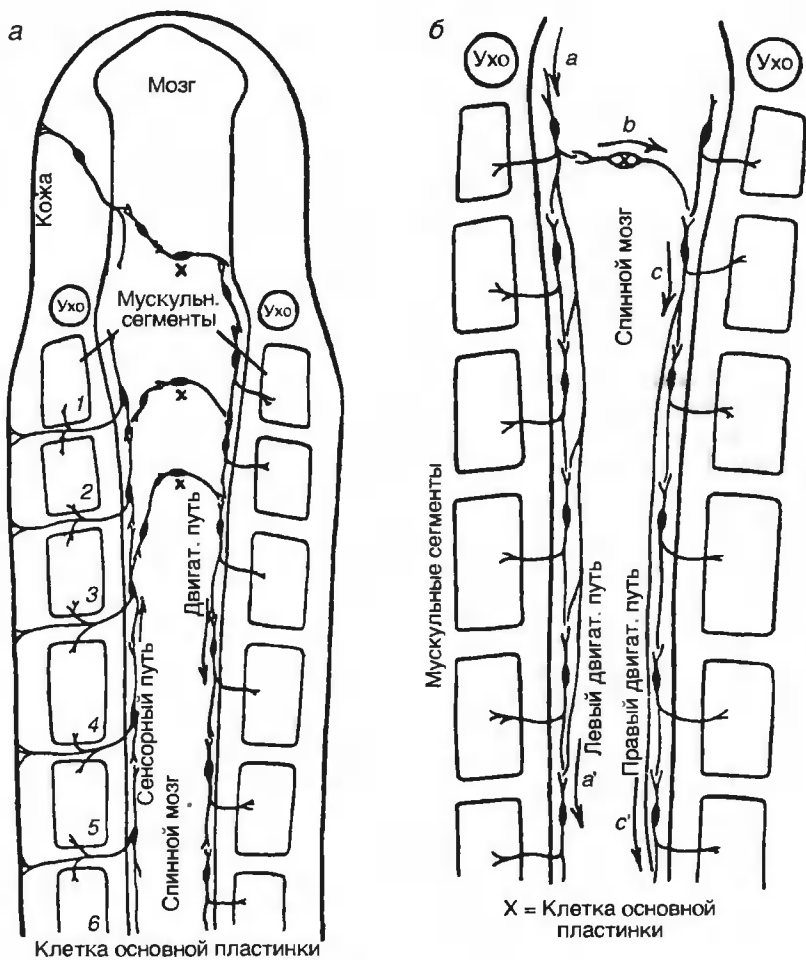


Рис. 2.13. Развитие нервной системы амблистомы.

а – схема механизма амблистомы, на котором основана реакция петли, распространение движений от головы к хвосту и движение в сторону, противоположную раздражаемой. Раздражение кожи впереди уха возбуждает приводящий нейрон, который в свою очередь возбуждает спаечную клетку в основной пластинке. Эта клетка дальше направлена к хвосту в двигательном пути на противоположной стороне тела. Раздражение позади уха, будь оно приложено к коже (экстероцепторное) или к мускулу (проприоцепторное), возбуждает приводящие нейроны, также возбуждающие спаечные клетки основной пластинки, через которые импульс переходит к двигательному пути на другую сторону. Так как приводящая система передает импульсы к двигательной системе противоположной стороны и так как клетки основной пластинки на этой ступени образуют спайку только в головном мозгу и в переднем отделе спинного, то импульсы, возбужденные в любой точке тела, ближе к голове или ближе к хвосту, с кожи или в мускулах, могут вступить в нервно-двигательный механизм только с его переднего конца, а затем распространяются к хвосту. В результате отдельные изгибания начинаются с головы и переходят к хвосту.

б – схема нервно-двигательного механизма плавания у амблистомы. Сенсорный механизм не нарисован. Стрелки указывают направление проведения. Стрелкой *а* обозначен первоначальный импульс, который, переходя в направлении к хвосту к *а'* и дальше, возбуждает

стороны, а противоположной (см. рис. 2.13), так что движения зародышей в раннем периоде направлены в противоположную от раздражения сторону.

В то время, когда начинается плавание, от волокон передней части двигательного тракта отходят коллатерали и растут до связи с дендритами клеток основной пластинки (рис. 2.13, *b*). Благодаря этим коллатералям возбуждение, направленное к мышцам одной стороны, передается через спаечные клетки основной пластинки к двигательной системе противоположной стороны. На этом переходе к мышцам другой стороны встречается большее количество синапсов, чем на пути к мышцам первой, так что второе изгибание отстает от первого на очень короткий промежуток времени. Тем же способом, как импульс для первого изгибания возбудил второе, дальше импульс для второго вызывает третье и т.д.

Следовательно, формирование способности к плаванию в ходе индивидуального развития аксолотля обусловлено правильной последовательностью определенных фаз роста нервной системы, осуществление которых **создает структуру, в которой преформированы эти способности.**

Кроме того, из данных Когхила следует, что по крайней мере в онтогенезе амфибий первичны более “общие” поведенческие акты, а более простые как бы вычлениваются из них, так что локальные рефлексы возникают как специализированные элементы более общего механизма интеграции целого организма. Действительно, у зародыша аксолотля вначале появляются общие упорядоченные движения сомитов туловища – С-образные изгибы, позднее S-образные изгибы, когда туловище совершает волнообразные движения, распространяющиеся от головы к хвосту, как при плавании. Конечности движутся вместе с телом, но постепенно, по мере дифференцировки соответствующих отделов нервной системы они начинают выполнять самостоятельные движения.

Подобная последовательность в развитии движений была обнаружена у многих низших позвоночных. У костистых рыб, например, движения грудных плавников, челюстей и жаберных крышек вначале не дифференцированы и происходят синхронно с движениями всего туловища. Позднее эти движения становятся самостоятельными и координированными. Сходные закономерности были найдены у бесхвостых амфибий, у эмбрионов ящерицы. Похожая картина была выявлена и у цыпленка, у которого движения начинаются со сгибания шеи через 3–5

волну сокращений мышечных сегментов, распространяющуюся от головы к хвосту. К тому времени, когда животное способно плыть, от этих нейронов двигательного пути в передней части ответвляются коллатерали, растущие в направлении к средней плоскости тела до синапсов со спаечными клетками основной пластинки. Такие отношения изображены в *в*, где стрелкой обозначен переход импульса к двигательной системе противоположной стороны. В двигательной системе он направляется к хвосту согласно стрелкам *с* и *с'*. Этот импульс, который считали возбуждающим, может быть тормозящим. Эти коллатерали, служат ли они возбуждению или торможению, являются существенно новым добавлением к строению механизма, изображенного на предыдущем рисунке, и дают возможность животному с успехом использовать свою мышечную энергию для движения. По Когхиллу.

Таблица 2. Схема развития соматических двигательных реакций в филэмбриогенезе (по Волохову, 1968)

Животные	Типы соматических реакций		
	Спонтанные миогенные	Спонтанные нейромоторные	Рефлекторные
Беспозвоночные:			
Губки	+	-	-
Кишечнополостные	+	+	-
Низшие позвоночные			
Рыбы, амфибии	+	+	+
Высшие позвоночные			
Птицы	-	+	+
Млекопитающие	-	-	+

суток, когда конечности находятся еще на стадии зародышевой почки. На 5-7-е сутки волнообразные движения туловища, начинающиеся с шеи, распространяются назад, и конечности совершают пассивные движения вместе с туловищем. Спонтанные независимые движения конечностей появляются лишь позднее, хотя их можно вызвать электрическим раздражением на более ранних стадиях.

Однако принцип Когхила неприменим к млекопитающим, у которых дискретные рефлекторные реакции возникают очень рано, одновременно с движениями эмбриона в целом или даже раньше. Результаты сравнительно-онтогенетических исследований свидетельствуют о том, что в эволюционном ряду усложняющихся форм животных отмечается переход от спонтанных миогенных реакций к нейромоторным и дальше к рефлекторным (табл. 2).

Установлены морфологические корреляты ранних рефлекторных актов у зародышей млекопитающих. Так, первые рефлекторные движения у млекопитающих вызываются на тактильную стимуляцию области носа, особенно зоны вибрисс, а также других областей мордочки, иннервируемых верхнечелюстной и нижнечелюстной ветвями тройничного нерва. Центральная проекция этих чувствительных веточек, поднимающихся кверху от гассерова узла, лежит в области варолиева моста, где берет начало афферентный тригемино-спинальный тракт, идущий к верхним шейным сегментам спинного мозга. Гистологические данные показывают, что афферентные и эфферентные пути этой системы, а также их центральные образования структурно оформляются к моменту появления рефлексов. В период, предшествующий появлению первых рефлексов с мордочки, у эмбриона кролика (15-й день развития) обнаружено большое количество закладок вибрисс и высокий уровень развития их нервного аппарата. На 16-й день (срок появления рефлексов) количество закладок вибрисс удваивается и каждая из них снабжается своим нервным стволиком. В этот период кожа области носа по интенсив-

П.К. Анохин. Выдающийся российский физиолог, ученик И.П. Павлова.
Автор концепции системогенеза.

ности развития сложных рецепторных аппаратов – вибрисс намного превосходит все другие участки кожи.

Следовательно, физиологические данные и коррелирующие с ними морфологические факты свидетельствуют о том, что первые двигательные реакции у плодов млекопитающих, являясь по своей природе **рефлекторными**, осуществляются через ограниченные созревшие очаги центральной нервной системы (продолговатый мозг, шейный отдел спинного мозга). Таким образом, спинной мозг млекопитающих развивается не по типу продольно проводящей системы, как это показано Когхилом у аксолотля, а по типу созревания отдельных сегментов. Обобщая эти данные, русский физиолог П.К. Анохин выдвинул в 40–50-е годы концепцию **системогенеза нервной деятельности**. Суть этой концепции состоит в том, что она рассматривает онтогенетическое развитие рефлекторной деятельности как процесс **гетерохронного** созревания функциональных систем. Под функциональной системой как морфофункциональной единицей понимается комплекс центральных нервных образований и связанных с ними периферических воспринимающих и рабочих аппаратов, объединенных для выполнения какой-либо специализированной функции организма, например сосания, локомоции, плавания, хватания и заглатывания пищи и т.д. С точки зрения теории системогенеза нет принципиальной разницы между первичным проявлением локальных или тотальных форм поведения. В зависимости от того, какая функциональная система прежде всего необходима организму для приспособления к определенному фактору внешней среды, раньше появляется либо тотальная (плавание у аксолотля), либо локальная (сосание, хватание у млекопитающих) форма двигательной активности. Исполнение такой реакции обеспечивается ускоренным созреванием соответствующей морфологической системы нейронов (модулей), ее осуществляющей.

Таким образом, специфика поведенческих реакций и уровень их сложности определяются сложившимися в процессе эволюции и формирующимися в ходе индивидуального развития особенностями организации нервной системы и характером взаимодействий составляющих ее компонентов (нейронные ансамбли, модули).



ЛИТЕРАТУРА

Верещагин С.М., Лапичин В.И. Сравнительная физиология нервной системы беспозвоночных. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982.

Детьер В., Стеллер Э. Поведение животных. Л.: Наука, 1967.

Дьюсбери Д. Поведение животных: Сравнительные аспекты. М.: Мир, 1981.

Когхилл Дж. Анатомия и проблемы поведения. М.; Л.: Биомедгиз, 1934.

Крушинский Л.В., Зорина Э.А., Полятаева И.И., Романова Л.Г. Введение в этологию и генетику поведения. М.: Изд-во МГУ, 1983. 2-е изд., 1999.

Физиология поведения: Нейробиологические основы. Л.: Наука, 1987.

Шенард Г. Нейробиология. Т. 1–2. М.: Мир, 1987.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

Глава 3

НЕЙРАЛЬНАЯ ИНДУКЦИЯ: ФЕНОМЕНОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Феномен нейральной индукции (т.е. индукции образования первичного зачатка центральной нервной системы) в раннем эмбриональном развитии позвоночных, описанный в начале XX в., относится к наиболее интересным и пока довольно загадочным процессам (рис. 3.1). Трудно, пожалуй, назвать иную проблему эмбриологии и биологии развития, которая привлекала бы и продолжает привлекать такое внимание многих научных групп. Так случилось, что процесс нейральной индукции, характерный для развития позвоночных, изучался в основном на зародышах амфибий. Эта тенденция прослеживается и в настоящее время, хотя появляется все больше публикаций, посвященных нейральной индукции у зародышей рыб, птиц и млекопитающих. Что же касается беспозвоночных животных и в первую очередь классического объекта генетики развития – плодовой мушки *Drosophila*, то здесь явления типа эмбриональных индукций имеют меньшее в сравнении с позвоночными значение. Скорее всего, у *Drosophila* присутствует ряд аналогичных процессов в формировании нервной системы, который прослеживается и у других беспозвоночных. Это связано с различиями в стратегиях эмбрионального развития между, скажем, шпорцевой лягушкой (*Xenopus laevis*) – излюбленным объектом биологии развития позвоночных и плодовой мушкой (*Drosophila melanogaster*) или почвенной нематодой (*Caenorhabditis elegans*) – модельными объектами генетики развития беспозвоночных.

Как известно, амфибии – малоподходящий объект для генетических экспериментов вследствие больших размеров генома и очень длительного генерационного (т.е. “от яйца до яйца”) периода. Поэтому долгое время феномен нейральной индукции, продемонстрированный на модели развития амфибий, был недоступен для анализа с использованием традиционных генетических методов. Ситуация начала меняться вследствие открытия принципа универсальности генетических регуляторных процессов, приводящих к формированию основных осевых структур зародыша (так называемого “плана строения тела” зародыша). Мы имеем в виду, в первую очередь, открытие гомеобокс-содержащих регуляторных генов, которые определяют развитие многих, если не всех изученных многоклеточных животных. Структурное и функци-

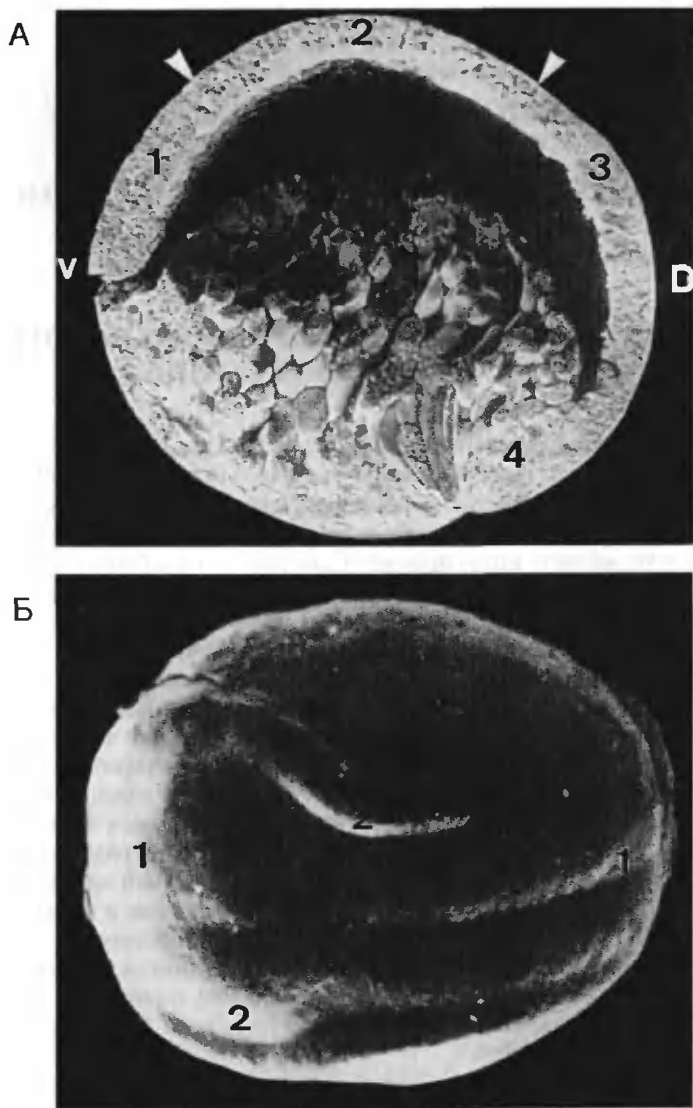


Рис. 3.1. Зародыши амфибий на стадии ранней гаструлы (А) и ранней нейрулы (Б).

А – фронтальное сечение вдоль вентро-дорсальной (V-D) оси зародыша (1 – вентральная эктодерма; 2 – эктодерма анимального полюса; 3 – дорсальная эктодерма; 4 – дорсальная губа бластопора, так называемый шпеманновский “организатор”, см. текст).

Б – внешний вид зародыша со стороны нервной пластинки (1 – нервная бороздка; 2 – нервные валики).

В нормальном развитии зачаток центральной нервной системы (нервная пластинка) образуется из дорсальной эктодермы под влиянием нейро-индуцирующих стимулов, поступающих от дорсальной губы бластопора.

ональное сходство этих генов позволило “перенести” на позвоночных, в том числе и амфибий, генетические регуляторные принципы раннего развития *Drosophila*. С другой стороны, внедрение в биологию развития позвоночных молекулярно-генетических методик позволило идентифицировать гены-регуляторы и их белковые продукты непосредственно в зародышах. Накопление описательно-молекулярной информации с возможностью генетического манипулирования развитием привело к изменению всей системы представлений о нейральной индукции и о механизмах, определяющих выбор эмбриональными клетками нейрального направления дифференцировки. Вместе с тем, несмотря на явный прогресс, проблема нейральной индукции еще далека от окончательного разрешения и, как мы увидим далее, сохраняет некоторые “мистические” свойства.

Большая часть актуальной информации о нейральной индукции была получена с использованием зародышей амфибий, в частности шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*). Поэтому основной материал, представленный в этой главе, касается механизмов раннего развития именно этого вида амфибий, и лишь в заключение делается попытка экстраполяции полученных данных на другие модельные объекты (зародыши рыб, птиц и млекопитающих).

Нейральная индукция. Эмбриологическая феноменология

У зародышей амфибий первые морфологически различимые признаки нейральной дифференцировки обнаруживаются на стадии поздней гастрюлы и проявляются в утолщении срединно-дорзальной области эктодермы, покрывающей более глубоко расположенный тканевой слой, содержащий хордомезодерму. В этой области клетки эктодермы удлиняются, а их наружная поверхность уменьшается. В результате на дорзальной стороне зародыша намечается продольная борозда, вдоль которой формируется утолщенный участок грушевидной формы. Это и есть первичный зачаток центральной нервной системы, так называемая нервная пластинка (см. рис. 3.1). У амфибий образование нервной пластинки определяется сигналами, поступающими из специальной области раннего зародыша, получившей название “организатор”.

Почему этот несколько архаичный термин начала XX столетия не утратил своего значения до наших дней? Для ответа на этот вопрос обратимся к классической работе Ганса Шпеманна (Spemann) и Хильды Мангольд (Hilde Mangold), опубликованной в 1924 г. В ней был экспериментально продемонстрирован и концептуально определен феномен эмбриональной индукции. Авторы использовали зародышей двух видов тритонов, различающихся по окраске эмбриональных тканей, что позволяло проследить за судьбой клеток при трансплантации. На стадии ранней гастрюлы из одного более “темного” зародыша вырезали участок будущей (презумптивной) хордомезодермы (так называемая “дорзальная губа бластопора”) и имплантирова-



Ганс Шпеманн (Hans Spemann). Автор открытия феномена эмбриональной индукции в развитии позвоночных (фотография из семейного архива сына Шпеманна). Выдающийся немецкий эмбриолог, чьи открытия определили многие направления экспериментальной эмбриологии в XX веке.

ли его в вентральную эктодерму более “светлого” зародыша (рис. 3.2). В нормальном развитии вентральная эктодерма дает начало покровному эпидермису, не участвует в формировании нервной системы и не содержит нейральных клеток-предшественников. В результате у зародыша-реципиента наблюдали образование двух осевых комплексов: одного – как обычно, другого – на месте имплантации дополнительной дорзальной губы бластопора. Каждый осевой комплекс содержал зачаток нервной системы. В наиболее удачных случаях формировались “удвоенные” личинки, напоминающие сиамских близнецов. Гистологический анализ показал, что имплантированная дорзальная губа бластопора способна рекрутировать эктодермальные клетки зародыша-реципиента к выполнению не свойственных им функций за счет изменения типичного для них направления дифференцировки. В результате в пределах эктодермального поля зародыша-реципиента формируются мезодермальные ткани (мышечные сомиты), вторичная кишка и зачаток центральной нервной системы. Но что самое интересное, имплантированная дорзальная губа бластопора не только индуцировала развитие этих разнообразных тканей, но и определяла передне-заднюю полярность мини-зародыша, т.е. пространственно “организовывала” развитие индуцированного зародыша-двойника. Именно поэтому дорзальную губу бластопора ранней гастрюлы амфибий стали называть “организатором”, а в последние годы, в честь первооткрывателя ее индуцирующих свойств, – шпеманновским организатором. Кстати, за это открытие Г. Шпеманну была присвоена в 1935 г. Нобелевская премия – первая и долгое время единственная Нобелевская премия за исследования в области эмбриологии. Ну а что случилось с Хильдой Мангольд – основным соавтором Г. Шпеманна? Почему ее имени нет среди лауреатов Нобелевской премии? Современники отмечают, что эта милая, отзывчивая женщина обладала большим научным потенциалом и была блестящим экспериментатором. Нелепый случай оборвал ее жизнь два года спустя после завершения основных опытов (1921–1922), незадолго

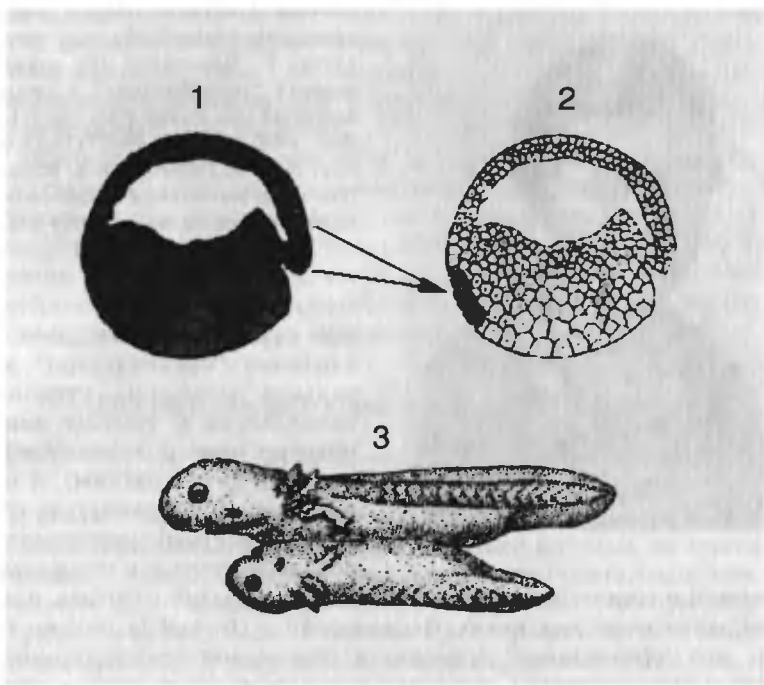


Рис. 3.2. Принципиальная схема опыта Г. Шпеманна и Х. Мангольд (так называемый organizer experiment; использованы фрагменты рисунков из: Gilbert, 1997). 1 – зародыш-донор дорзальной губы бластопора; 2 – зародыш-реципиент имплантированной дорзальной губы бластопора; 3 – личинки-двойники, каждая из которых содержит помимо других структур хорошо развитую нервную систему.

до выхода в свет их совместной с Г. Шпеманном статьи (1924), посвященной эмбриональному “организатору”.

В 1932 г. группа исследователей, возглавляемая Г. Шпеманном, экспериментально демонстрирует, что: (1) инактивированные нагреванием ткани “организатора” сохраняют свои индуцирующие свойства при их имплантации в вентральную эктодерму; (2) культуральная среда из-под изолированного “организатора” обладает индуцирующей активностью. Стало ясно, что индуцирующие сигналы “организатора” должны иметь химическую природу. С этого момента предпринимаются неоднократные попытки идентифицировать индуцирующие молекулы, определить их свойства и механизмы действия. Эта трудоемкая, подчас героическая работа по биохимическому фракционированию бесклеточных экстрактов из эмбриональных тканей осложнялась также несовершенной и трудоемкой системой биотестирования полученных фракций. В соответствии с исходными данными Шпеманна и Мангольд (1924) в качестве эмбриональной тест-ткани использовали вентральную эктодерму ранней гастролы амфибий. Эта эктодерма еще до гастролы коммитиро-



Хильда Мангольд (Hilde Mangold; урожденная Proscholdt) – основной соавтор Г. Шпеманна по изучению свойств “организатора” в развитии амфибий (из: Fabler P.E., Int. J. Devel. Biol. 1996, v. 40, p. 49–57). Как отмечает Виктор Гамбургер, Х. Мангольд блестяще выполняла самые сложные манипуляции по пересадкам эмбриональных тканей.

вана к развитию в эпидермис. Под влиянием “организатора” вентральная эктодерма утрачивает способность к синтезу эпидермальных маркеров (эпимуцин, некоторые цитокератины), и в ней начинают обнаруживаться транскрипты нейроспецифических генов, характерных в основном для

переднего и среднего мозга (так называемая передне-головная, или архенцефалическая, индукция). По аналогии с *Drosophila*, можно говорить, что “организатор” приводит к нейральной трансдетерминации вентральной эктодермы гастрюлы, т.е. к “переключению” с эпидермальной на нейральную дифференцировку.

В связи с этим уместно представить ряд формальных определений индукционных взаимодействий. В первом приближении под эмбриональной индукцией подразумевается ситуация, в которой путь развития одной клеточной популяции контролируется сигналами, поступающими от другой группы эмбриональных клеток. По своим последствиям эмбриональные индукции можно подразделить на две большие группы: директивные (предписывающие) и перmissive (разрешающие). Эта, предложенная Лаури Саксеном (Saxen) классификация, несмотря на критические высказывания, оказалась удобной в понятийном смысле и получила подтверждение во многих экспериментальных ситуациях. Различие между директивными и перmissive индукционными взаимодействиями укладывается в очень простую схему. В случае перmissive индукции отвечающие клетки под влиянием специфического сигнала начинают свою, предписанную им ранее, дифференцировку; в отсутствие сигнала такие клетки не способны к развитию. Таким образом, перmissive индуцирующие сигналы лишь разрешают реализацию уже имеющейся программы дифференцировки данной группы клеток. В случае директивной индукции происходит качественное изменение программы развития клеток-мишеней. Если по каким-либо причинам реагирующие клетки “ускользают” из-под директивных сигналов, то они способны следовать в дальнейшем по пути своей исходной дифференцировки. Нетрудно заметить, что нейрализирующая активность Шпеманновского “организатора” хорошо вписывается в определение дире-

ктивных эмбриональных индукций. Так, эктодерма гастрюлы амфибий при ее изоляции от индуцирующих влияний “организатора” способна к “самодифференцировке” в эпидермис. “Организатор” отменяет эту программу дифференцировки и предписывает эктодермальным клеткам нейтральный путь развития.

Шпеманновский “организатор” секретирует коктейль различных сигнальных молекул, которые индуцируют в отвечающей эктодерме образование как нервной ткани, так и производных мезодермы. При этом формирование нервной пластинки является, по-видимому, суммирующим результатом двух сопряженных процессов: ингибирования эпидермальной дифференцировки и активирования нейтральной программы развития в клетках эмбриональной эктодермы.

Нейтральная индукция: молекулы-активаторы

Выход из застойного периода

Работы Г. Шпеманна и его школы пробудили живой интерес к проблемам эмбриональной индукции. Несколько научных лабораторий в Германии, Англи, Голландии и Финляндии приступили к поискам индуцирующих агентов, используя в качестве тест-ткани эктодерму ранней гастрюлы амфибий. Было получено много результатов, что, однако, привело не к триумфу, а к забвению идеи Шпеманна. Оказалось, что не только “живые” или “убитые” эмбриональные зачатки-организаторы, но и многие другие ткани и органы взрослых животных, а также ряд органических и неорганических веществ способны провоцировать нейтрализацию эктодермы в эксперименте. Разнообразие этих агентов и их широкое распространение в тканях многих животных не поддавалось рациональному объяснению, что привело к смущению в рядах последователей Шпеманна и поставило под сомнение феномен нейтральной индукции.

В результате ведущие эмбриологические лаборатории постепенно утратили интерес к подобным исследованиям. Лишь отдельные группы энтузиастов продолжали поиски молекулярных посредников индукционных взаимодействий. Однако их усилия не приводили к ощутимым результатам. Хотя уже было ясно, что нейтральные индукторы имеют белковую природу, обнаружить соответствующие молекулы у зародышей позвоночных не удавалось. Главная причина заключалась в незначительной концентрации этих регуляторов в эмбриональных клетках и в ничтожных количествах исходной ткани “организатора”.

Стремясь обойти эти методические затруднения, группа исследователей, возглавляемая Хейнцем Тидеманном (Heinz Tiedemann), предприняла попытки экстрагировать нейтрализующие агенты не из отдельных эмбриональных зачатков, а из целых зародышей амфибий, что, по крайней мере, позволяло получить стартовый материал, достаточный для последующего многоэтапного биохимического фракционирования. Этот прием оправдал себя: были получены частично очищенные белковые фракции, вызывающие образование нервной ткани в эктодерме га-



Хейнц Тидеманн (Heinz Tiedemann) – известный немецкий биохимик и молекулярный биолог, один из основателей биохимического направления в исследовании эмбриональной индукции. Его небольшая научная группа смогла впервые в мире выделить из зародышей очищенный полипептидный фактор, способный индуцировать производные мезодермы и энтодерму. Позднее было показано, что этот фактор сходен с активином. С 1967 по 1991 г. Тидеманн возглавлял Институт биохимии и молекулярной биологии Свободного университета в Берлине. Ближайшим помощником и соавтором в те годы была его жена Хильдегард Тидеманн (Hildegard Tiedemann), проводившая биотестирование индуцирующей активности белковых фракций.

струлы амфибий в дозовой зависимости. Однако финальная очистка нейтрализующих факторов не была достигнута и, следовательно, их свойства и механизмы действия служили предметом для поверхностных спекуляций.

Мы избрали иной подход, основанный на поисках не “естественных” индукторов, экспрессирующихся в шпеманновском “организаторе” амфибий, а их функциональных аналогов, которые, как мы предполагали, могут синтезироваться в нейральной ткани зародыша на продвинутых стадиях эмбрионального развития или во взрослом головном мозге. Более того, мы исходили из соображения об относительно невысокой видовой специфичности нейральных индукторов. Именно поэтому в качестве тканевого источника мы остановили свой выбор на переднем мозге куриных зародышей, что позволяло получать значительные количества нервной ткани без примесей других типов клеток. Биотестирование экстрактов и фракций из головного мозга куриных зародышей проводили на эксплантатах эктодермы ранней гастролы амфибий. Первые результаты казались нам многообещающими: были идентифицированы нейтрализующие фракции, содержащие низкомолекулярные полипептиды, проявляющие средство к гепарину. Однако на финальных этапах очистки нейтрализующая активность этих фракций либо полностью утрачивалась, либо значительно снижалась.

Не лучше обстояло дело и с идентификацией других индуцирующих агентов, определяющих дифференцировку производных мезо- и энтодермы. Все чаще и чаще стали высказываться сомнения в реальности существования молекулярных посредников эмбриональных индукций, практически “вышли из моды” публикации на эту тему в международных журналах. В результате неоднократных обсуждений этой ситуации с Л. Саксенем А.Т. Михайлов пришел к выводу о необходимости критической ревизии накопленного экспериментально-



Застойные восьмидесятые: дискуссии о природе и молекулярных посредниках эмбриональной индукции продолжались и в гостеприимном доме Л. Саксена, расположенном недалеко от отдела патологии Хельсинского университета. Справа профессор Л. Саксен, слева профессор А.Т. Михайлов ("Sasha", как все меня звали в Хельсинском университете. — А.М.). Не только талант, эрудиция и логика, но и техническое мастерство и знание "подводных камней" экспериментальной "кухни" позволили Л. Саксену выдвинуть ряд оригинальных гипотез о механизмах эмбриональной индукции, оказавших влияние на многих исследователей, работавших в области экспериментальной эмбриологии позвоночных.

го материала в области биохимии эмбриональной индукции. В своем обзоре: “Морфогены: экспериментальная иллюзия или реальность?” (“Онтогенез”, 1984), он отметил три основных момента: (1) необходимость иного теоретического осмысления феномена эмбриональной индукции на основе молекулярно-генетических закономерностей развития; (2) необходимость молекулярно-биохимического анализа свойств отвечающих клеток до и после индуцирующих воздействий; (3) необходимость тестирования факторов из других тканей, включая и доступные биологически активные полипептиды, на индуцирующую активность, т.е. стратегия, основанная на поисках функциональных аналогов эмбриональных индукторов. Эта публикация была встречена в нашей стране с определенным скептицизмом.

Вместе с тем ряд зарубежных биологов развития и, в частности, Джонатан Слэк (Jonathan Slack), сам активно работающий в области эмбриональной индукции, обратил внимание на то, что поиск функциональных аналогов эмбриональных индукторов среди уже охарактеризованных биологически активных факторов – наиболее реальный подход к решению проблемы. Прошло всего три года, и Дж. Слэк показал, что так называемый “фактор роста фибробластов” (*Fibroblast Growth Factor* – FGF), выделенный из головного мозга быка, оказывает мощное индуцирующее воздействие на эктодерму гастрюлы амфибий, вызывая формирование в ней мезодермальных производных (Slack et al., 1987). Таким образом, впервые после открытия “организатора” было однозначно продемонстрировано, что индивидуальный полипептид, относящийся к ростовым факторам, может имитировать его активность и изменять судьбу эктодермальных клеток в эмбриональном развитии позвоночных.

Почти одновременно со статьей Дж. Слека появился ряд других сообщений о том, что супернатанты из-под различных клеточных линий также характеризуются мезодермализующей активностью. Поскольку культивируемые *in vitro* линии секретируют специфические полипептидные факторы, регулирующие (по аутокринному механизму) пролиферацию и выживание клеток, представлялось вполне логичным проверить, способны ли такие факторы оказывать нейтрализующее влияние на эктодерму гастрюлы амфибий. Долгое время этот подход не приносил ожидаемых результатов. Тем не менее, эта стратегия все же оказалась плодотворной и привела к идентификации белков, обладающих нейтрализующей активностью. Это, в свою очередь, повлекло идентификацию и клонирование соответствующих генов, изучение их экспрессии в шпеманновском “организаторе”, индукцию их гиперэкспрессии или блокаду активности таких генов в развитии и т.д.

Таким образом, как и предполагалось, выход проблемы эмбриональной индукции из стагнации осуществился благодаря идентификации соответствующих молекулярных медиаторов, что повлекло за собой целую серию тонких, блестящих экспериментов, заставивших по-иному трактовать процессы нейральной детерминации и дифференцировки в эмбриональном развитии.

Нейральные индукторы-активаторы

Естественные нейрализирующие факторы шпеманновского “организатора” относятся к разряду секретлируемых и способных к диффузии сигнальных молекул. Наиболее четко это было продемонстрировано группой финских исследователей при участии Лаури Саксена и Суло Тойвонена (Sulo Toivonen) в изящных экспериментах по разделению эктодермы и “организатора” (дорсальная губа бластопора) тритонов фильтрами разной толщины и с различным размером пор (так называемая “трансфильтовая” нейральная индукция). После нескольких часов “трансфильтового контакта” эктодермальные эксплантаты гистологическом анализе в них были обнаружены типичные передне-головные комплексы (рис. 3.3).

Кандидаты на роль естественных нейрализирующих агентов должны отвечать, по крайней мере, двум требованиям: они должны экспрессироваться в шпеманновском “организаторе” и относиться к секретлируемым белкам, способным к диффузии. Одним из первых таких белков оказался секретлируемый полипептид ноггин (noggin). Ген ноггина экспрессируется в шпеманновском “организаторе” и изначально предполагалось, что ноггин принимает участие в регионализации мезодермального пласта, способствуя формированию хорды. Однако опыты по инъекции мРНК ноггина в оплодотворенные яйца или полость ранних зародышей амфибий выявили совсем иные эффекты. В первом случае тело зародышей состояло преимущественно из головного отдела (отсюда и название фактора; от англ. noggin – голова). Во втором типе опытов наблюдали выраженную нейрализацию эктодермальных клеток.

Затем было обнаружено, что одна из трансформированных клеточных линий секретрует ноггин в культуральную среду, что значительно

Суло Тойвонен (Sulo Toivonen) – основатель биологии развития в Финляндии (из: Leikola A., *Int. J. Devel. Biol.*, 1989, v. 33, p. 15–20). В 1940 г. он продемонстрировал, что образование различных отделов нервной системы (передний, средний, задний и спинной мозг) регулируется различными индуцирующими влияниями, которые имеют, вероятно, белковую природу. С 1960 г. – руководитель отдела физиологической зоологии Хельсинкского университета (в этом отделе начинал научную карьеру Л. Саксен). С. Тойвонена отличала крайняя щепетильность в оценке работ других авторов, доброжелательность и готовность помочь коллегам.



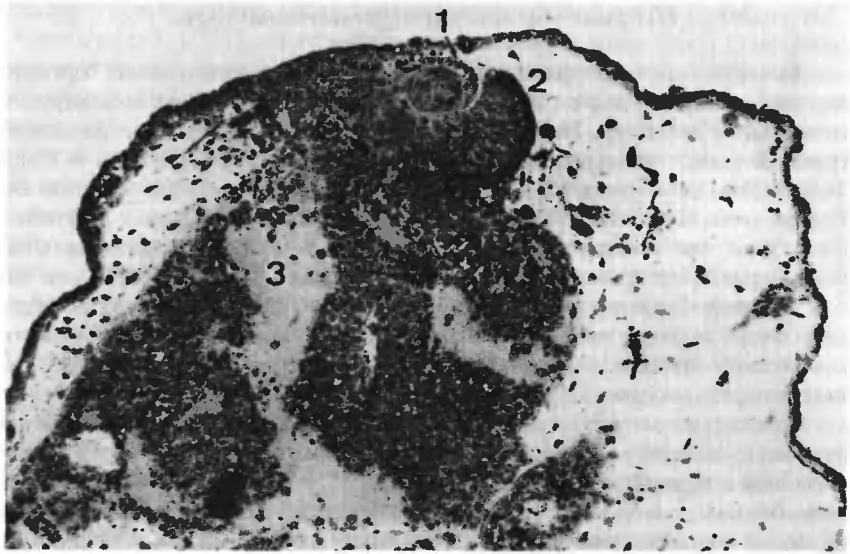


Рис. 3.3. Индукция так называемых “передне-головных комплексов” в эктодерме гастрюлы амфибий.

1 – хрусталик; 2 – глаз (сетчатка с пигментным эпителием); 3 – ткань мозга: видно разделение ткани на “серое” (нейрофины) и “белое” (их отростки) вещество.

упростило его выделение в чистом виде. Очищенный белок индуцировал в эксплантатах эктодермы гастрюлы нервную ткань без каких-либо признаков мезодермальных дифференцировок. При этом, однако, выявилось одно слабое звено: ноггин оказывает нейтрализующий эффект при наномолярных концентрациях в культуральной среде, так как “типичные” сигнальные молекулы (например, гормоны или митогенные факторы) работают на пикомолярном уровне. Ситуация осложняется и тем, что аминокислотная последовательность ноггина не обнаруживает областей протяженной гомологии ни с одним из известных белков и механизм действия ноггина пока неизвестен. Правда, показано, что два гена-мишени ноггина (*downstream target genes*), а именно *otx 2* и *XIPou 2*, участвуют в процессах нейтрализации эктодермы шпорцевой лягушки.

Следующим кандидатом на роль нейрального индуктора оказался полипептидный фактор фоллистатин (*follistatin*). Ранее фоллистатин был идентифицирован у млекопитающих как секреторный белок, который блокирует способность иного фактора, активина (*activin*), стимулировать высвобождение фолликул-стимулирующего гормона. Связывание и инактивация активина – основная функция фоллистатина на продвинутых стадиях эмбрионального развития и во взрослом состоянии. Вместе с тем у ранних зародышей амфибий этот фактор участвует в процессах нейральной индукции. Показано, что фоллистатин экспрессируется в шпеманновском “организаторе” и, подобно ноггину, инъекция мРНК фоллистатина в зародыши амфибий вызывает нейтрализа-

цию эмбриональной эктодермы, причем эффект является дозово-зависимым. Однако рекомбинантный человеческий фоллистатин, добавленный в культуральную среду с эксплантатами эктодермы ранней гастрюлы амфибий, не проявлял никакого нейрализующего действия.

Интересно, что активин также секретируется “организатором” амфибий и в низких концентрациях способен поддерживать эпидермальную дифференцировку эмбриональной эктодермы. Это навело на мысль, что нейрализующее действие фоллистатина является непрямым: связываясь с активином, фоллистатин тем самым ингибирует эпидермальную дифференцировку, что является, как отмечалось выше, одним из условий начала нейрализации эктодермы гастрюлы амфибий. Скорее всего, нейрализующий эффект фоллистатина является активин-опосредованным (подробнее см. следующий раздел).

Очень перспективные данные были получены при исследовании свойств еще одного секретируемого полипептида, названного хордин (chordin). Как и указанные выше факторы, хордин экспрессируется в шпеманновском “организаторе”, и его кДНК оказалась наиболее представительной среди пула так называемых “дорзо-специфичных” кДНК этого зачатка. В нормальном развитии хордин впервые обнаруживается в презумптивном “организаторе” на стадии поздней бластулы, где и продолжает экспрессироваться в процессе гастрюляции. На более поздних стадиях развития его экспрессия ограничивается хордой (отсюда и название фактора). Инъекция мРНК хордина в вентральную область бластулы амфибий приводит к формированию вторичного осевого комплекса. Иначе говоря, *in vivo* хордин способен имитировать эффекты, вызываемые имплантацией “организатора” в вентральную эктодерму зародышей. *In vitro*, добавление высокоочищенного белка хордина к культивируемым эктодермальным эксплантатам эктодермы гастрюлы приводит к выраженным нейрализующим эффектам.

Сравнение хордина амфибий с известными последовательностями обнаружило значительное его сходство с геном *sog Drosophila*. У зародышей *Drosophila* количество нейрогенной эктодермы регулируется дорзо-вентральной системой позиционной информации. Важную роль в этой системе играют два типа секреторных полипептидных факторов с антагонистическими функциями. Один белок кодируется геном *decapentaplegic (dpp)*, а его функциональный антагонист – геном *short-gastrulation (sog)*. У позвоночных, гомологом *dpp* являются члены семейства так называемых морфогенетических белков кости” (Bone Morphogenetic Proteins – BMPs), в то время как гомологом *sog* является хордин. Существенно, что BMPs, как и активин, экспрессируются в шпеманновском “организаторе” и других тканях гастрюлы амфибий. По аналогии с *Drosophila*, можно думать, что в развитии амфибий нейрализующий эффект хордина проявляется на фоне антагонистических влияний BMPs и активина (т.е. влияний, способствующих эпидермальной дифференцировке эктодермы). Хотя у зародышей амфибий реальные механизмы предполагаемых антагонистических взаимодействий в системе “хордин>BMPs” неизвестны, показано, что *in vitro* хордин связывается с BMPs.

У амфибий, регуляция нейрализующей активности хордина находится под контролем металлопротеаз. Одна из них, а именно секретируемая металлопротеаза Xolloid отменяет нейрализующую активность хордина, но не ноггина или фоллистатина. Хордин, обработанный Xolloid, утрачивает способность связываться с BMPs. Таким образом, на примере хордина можно видеть, сколь сложным может оказаться механизм действия нейрализующих агентов в зародыше.

Вторым после хордина геном, наиболее представленным среди дорзо-специфичных кДНК последовательностей шпеманновского “организатора”, оказался ген, названный церберус (*cerberus*; по кличке мифологического трехголового пса Цербера, охранявшего вход в подземное царство). Соответствующая церберусу кДНК кодирует секреторный полипептид из 270 аминокислотных остатков, не имеющий существенной гомологии с известными белками. Введение в ранние зародыши амфибий мРНК церберуса приводит к эктопическому образованию новых, дополнительных голов (отсюда и название фактора!), каждая из которых содержит ткань переднего-среднего мозга, циклопический глаз и обонятельные клетки. Те же самые переднеголовные структуры образуются при культивировании *in vitro* кусочков эктодермы, выделенных из инъецированных зародышей на стадии ранней гаструлы. В этом случае, однако, в эктодерме наряду с нейральными обнаруживаются и мезодермальные маркеры.

Естественно, что прием, основанный на введении в ранние зародыши мРНК, страдает одним существенным недостатком: мы не можем контролировать рекрутирование инъецированной последовательности разными эмбриональными тканями. Соответственно, до тех пор, пока не будет выделен белковый препарат церберуса, представляется затруднительным судить о механизмах его действия именно на эктодермальные клетки. В нормальном развитии амфибий церберус экспрессируется в наиболее глубоких слоях “организатора” и его транскрипция активируется фоллистатином, хордином и ноггином.

Еще несколько ростовых факторов млекопитающих, идентифицированных в шпеманновском “организаторе”, способны нейрализовать эктодерму ранней гаструлы амфибий. Один из них, Xhp 3, относится к семейству так называемых “трансформирующих факторов роста” (Transforming Growth Factors – TGFs); введение зародышам его мРНК индуцирует экспрессию нейроспецифических генов в эктодермальных клетках. Два других фактора (FGF 3 и FGF 4) принадлежат к семейству факторов роста фибробластов и способны вызывать *in vitro* нейрализацию эктодермы гаструлы амфибий, но только при условии ее предварительной дезагрегации на отдельные клетки (см. следующий раздел). При использовании целых (т.е. недиссоциированных на клетки) эктодермальных эксплантатов нейрализующие эффекты наблюдали лишь при очень высоких, “нефизиологических” концентрациях FGFs в культуральной среде. Последнее указывает на то, что эти факторы скорее действуют в совокупности с другими нейрализующими агентами шпеманновского “организатора”, приводя к аддитивному положительному эффекту. Возможно также, что они способствуют вовлечению эктодер-

мальных клеток, соседствующих с первичноиндуцированным нервным участком, в нейрогенез (т.е. являются факторами экспансии нейральной дифференцировки в пределах эктодермального поля).

Не только секретируемые “организатором” сигнальные полипептиды-эффекторы, но и некоторые гомеобокс-содержащие гены также играют значительную роль в нейральной индукции. Один из таких генов (*Xlim-1*), относящийся к LIM-семейству гомеобокс-содержащих генов, экспрессируется в Шпеманновском “организаторе”, и введение зародышам его мРНК вызывает индукцию синтеза нейроспецифических транскриптов в эктодерме гастрюлы. Более того, *Xlim-1* инициирует экспрессию хордина, но не ногтина и фоллистатина, что указывает на определенные различия в регуляции синтеза этих трех нейральных индукторов в нормальном развитии амфибий.

Наконец, *Xlim-1* и еще один гомеобокс-содержащий ген, *Siamois*, определяют способность Шпеманновского “организатора” к индукции головных структур. В частности, экспериментально спровоцированная гиперэкспрессия *Siamois* in vivo приводит к формированию у головастиков дополнительного передне-головного отдела с глазами и присосочной железой. В нормальном развитии амфибий наиболее высокие уровни экспрессии этого гена обнаружены на стадии поздней бластулы – ранней гастрюлы, т.е. в начальный период проявления нейрализующей активности шпеманновского “организатора”.

В подавляющем большинстве случаев идентификацию и анализ действия нейрализующих активаторов проводили на одном и том же виде амфибий (шпорцевая лягушка, *Xenopus laevis*) с использованием сходных методических приемов. Это во многом облегчает сопоставление полученных разными авторами данных и позволяет сделать ряд предварительных заключений. Очевидно, что и на молекулярном уровне нейральная индукция – не одномоментная акция, а многоступенчатый процесс, в котором участвуют несколько сигнальных агентов-активаторов, синтезируемых шпеманновским “организатором”. Эти сигнальные молекулы различаются по своей структуре, свойствам и механизмам действия на эктодермальные клетки-мишени. Иначе говоря, нейральные активаторы не являются семейством родственных факторов. Напротив, каждый из них характеризуется своим, подчас весьма специфическим механизмом действия, и вызываемый ими конечный сходный эффект (т.е. нейрализация эктодермальных клеток) зависит от многих других факторов и условий.

Ранее мы могли объяснить разнообразие таких факторов как отражение определенной “неспецифичности” нейрализующего действия шпеманновского “организатора”, роль которого заключалась бы лишь в перmissiveм воздействии на эктодерму, которая до начала гастрюляции предрасположена (преддетерминированна) к нейральной дифференцировке. В настоящее время, однако, ситуация изменилась коренным образом, так как оказалось, что выбор эктодермой нейрального направления дифференцировки представляет собой результат антагонистических взаимодействий между активаторами и ингибиторами. Под последними подразумеваются полипептидные сигнальные молекулы,

синтезируемые как шпеманновским “организатором”, так и реагирующей эктодермой ранней гаструлы амфибий, которые препятствуют нейтрализации в нормальном развитии. Ингибиторы общего метаболизма и вещества, оказывающие токсическое, повреждающее действие на эмбриональные клетки, не относятся, по определению, к естественным антагонистам нейтральных активаторов.

Нейральная индукция: молекулы-ингибиторы

В нормальном развитии нейральная индукция проявляется в образовании в пределах эктодермального поля нервной пластинки, имеющей характерную форму, передне-заднюю полярность и осевую симметрию. Предполагалось, что пространственная организация и “размещение” нервного зачатка изначально определяются градиентом гипотетического нейтрального индуктора, активирующего эктодермальные клетки к превращению в клетки, характерные для передне-головных мозговых структур. Если эта гипотеза не лишена смысла, то можно предположить, что пространственная организация и объем нервной ткани определяется, главным образом, наличием нейтрального активатора и его локальной концентрацией в эктодерме (принимая, конечно, что все эктодермальные клетки компетентны, т.е. способны воспринимать нейтрализующие сигналы).

Насколько эти соображения отвечают ситуациям, имеющим место в нормальном развитии? Для ответа на этот вопрос обратимся к данным, свидетельствующим о наличии в эктодерме гаструлы амфибий ингибиторов нейтральной дифференцировки.

Эффекты дезагрегации–реагрегации эктодермальных эксплантатов

Провоцирующим моментом в поисках естественных нейтральных ингибиторов послужили опыты по изучению влияния диссоциации кусочков эктодермы ранней гаструлы амфибий на дифференцировочную судьбу изолированных клеток. Несколько научных коллективов, руководствуясь различными идеями и используя разнообразные методические приемы, продемонстрировали неизвестный ранее феномен: дезагрегация эктодермы приводит, без каких-либо дополнительных внешних воздействий, к превращению изолированных клеток в нейроны, что сопровождается активацией нейроспецифичных генов и типичными структурными изменениями.

Не беремся утверждать, но как нам кажется, только Хорст Грунц (Horst Grunz, 1997) с коллегами предвидели подобные результаты, и именно они наиболее полно охарактеризовали обнаруженные эффекты. Во-первых, было показано, что и вентральная и дорзальная области эктодермы содержат клетки, способные после нарушения клеточных контактов изменять эпидермальное направление дифференцировки и вставать на путь нейтрального развития. Во-вторых, оказалось, что

концентрированные среды из-под эктодермальных клеточных суспензий. ингибируют нейрализацию целых фрагментов эктодермы, совмещенной *in vitro* с дорзальной губой бластопора (шпеманновский “организатор”).

Хотя соответствующие ингибиторы не идентифицированы, очевидно, что они являются естественными компонентами эктодермы гастрюлы амфибий. Последнее указывает на то, что процесс нейральной индукции в нормальном развитии находится, возможно, под негативным контролем эндогенных эктодермальных ингибиторов, которые инактивируют нейрализирующие сигналы, поступающие в эктодерму от шпеманновского “организатора”. В отсутствие нейрализирующих воздействий эти эндогенные ингибиторы, возможно, играют иную роль: стабилизируют или поддерживают эпидермальное направление дифференцировки клеток эктодермы. Во всяком случае, при сохранении клеточных контактов эктодермальные эксплантаты развиваются в так называемый “атипичный” эпидермис (атипичный, так как отсутствует соединительнотканная строма), который экспрессирует специфичные эпидермальные маркеры.

Антагонисты и ингибиторы нейрализации эктодермы

Результаты опытов по дезагрегации эктодермальных эксплантатов вскоре получили новое и неожиданное значение в свете совсем иных экспериментальных данных. Уже было хорошо известно, что активин является мощным мезодермализующим индуктором и что эктодерма бластулы–гастрюлы амфибий экспрессирует соответствующие активиновые рецепторы. Экспериментальное инактивирование этих рецепторов привело к неожиданному результату, а именно к нейрализации эктодермы в отсутствие каких-либо нейрализирующих воздействий. Таким образом, еще раз было продемонстрировано, что эктодерма гастрюлы способна к так называемой “аутонейрализации”, т.е. способна превращаться в нервную ткань “сама по себе”, без контакта со шпеманновским “организатором”.

Напомним, что фоллистатин – эндогенный фактор, секретируемый шпеманновским “организатором”, инактивирует активин и вызывает нейрализацию эктодермы. Эти результаты наводили на мысль о том, что “организатор” секретирует сигнальные молекулы, которые не могут активировать нейрогенез, но способны подготовить эктодермальные клетки к выбору нейрального пути развития, “снимая” запрет на возможность такого выбора или подавляя действие нейро-антагонистических факторов.

Конечно, реальная ситуация намного сложнее таких достаточно прямолинейных предположений о механизмах нейральной индукции. Это демонстрируют, в частности, результаты по тестированию индуцирующей активности нормального и мутантного транскрипционного фактора *Brachyury*. Нативный фактор индуцирует в эктодерме шпорцевой лягушки развитие мезодермальных производных. Вместе с тем, мутация, вызывающая “укорочение” последовательности фактора от С-кон-

ца, полностью отменяет его мезодермализующую активность. Более того, мутантный фактор индуцирует в эктодермальных эксплантатах мозговые передне-головные структуры, включая глаза с хрусталиками, экспрессирующие соответствующие ткане-специфические маркеры.

В каких отношениях находится мутантный фактор *Brachyury* с полипептидами, активирующими или ингибирующими нейрализацию компетентной эктодермы? При избытке FGFs или при низких концентрациях активина мутантный фактор *Brachyury* характеризовался более мощным нейрализующим эффектом, что свидетельствует о положительной кооперации этих агентов на клеточном уровне. С другой стороны, нативный *Brachyury*, характеризующийся мезодермализующей активностью, полностью отменял нейрализующие эффекты мутантного фактора при их совместном введении в зародыши. Таким образом, можно предполагать, что нативный мезодермализующий фактор *Brachyury* вовлечен в процессы ингибирования выбора эктодермальными клетками нейрального пути развития.

Напомним еще раз, что нативный фактор *Brachyury* и активин являются мезодермальными, а не эпидермальными индукторами. Однако при низких концентрациях они способны, по-видимому, поддерживать процесс превращения клеток эктодермы в эпидермис (имеется ряд указаний на присутствие в клетках эктодермы гастролы амфибий “материнского” фактора *Brachyury* в следовых концентрациях). В этом и может заключаться не прямое ингибирующее действие таких факторов на процессы, активирующие нейральную трансформацию эктодермальных клеток в развитии.

Активин принадлежит к суперсемейству так называемых “трансформирующих факторов роста” (*Transforming Growth Factors – TGFs*). Вместе с тем, другие члены этого суперсемейства, так называемые “морфогенетические факторы кости” (*Bone Morphogenetic Proteins – BMPs*), проявляют свойства эпидермальных индукторов. В частности, BMP 4 вызывает мощную “эпидермализацию” эктодермы и, уже при пикомолярных концентрациях в культуральной среде, полностью блокирует способность диссоциированных на клетки эксплантатов превращаться в нервную ткань (см. выше). С другой стороны, экспериментально индуцированная гиперэкспрессия в ранних зародышах мутантного (функционально неактивного) BMP 4 вызывает нейрализацию эктодермы гастролы. По-видимому, мутантный фактор успешно конкурирует с нативным за соответствующие рецепторы эктодермальных клеток. Как следствие, нарушается процесс эпидермальной дифференцировки клеток эктодермы, что является условием ее последующей нейрализации.

Сходными свойствами обладают еще два фактора этой группы, BMP 2 и BMP 7. В процессе гастрюляции эти факторы экспрессируются в эктодерме животного полюса, и их синтез постепенно угасает в области формирования презумптивной нервной пластинки. Более того, инъекция в зародыши мРНК BMP 4 полностью блокирует процесс нейральной индукции, опосредованный хордином. Показано также, что хордин, ноггин и фоллистатин способны, хотя и с разной степенью аф-

финности, связываться с BMPs, препятствуя тем самым активации BMP-рецепторов клеток эктодермы. Еще один нейро-активирующий фактор, Хлг 3, образует с BMPs гетеродимеры, лишённые функциональной активности. Интересно, что любые иные экспериментальные воздействия, нарушающие передачу BMP-сигналов в пределах эктодермы, приводят к нейтрализации ее клеток.

Таким образом, в клетках эктодермы, которая еще до гастрюлы детерминируется к развитию в эпидермис, экспрессируются соответствующие факторы эпидермальной дифференцировки. По крайней мере часть из них способна образовывать комплексы с нейтральными индукторами, секретруемыми шпеманновским “организатором”, что до определенного момента препятствует нейтрализации эктодермальных клеток.

На основе этих и ряда дополнительных сведений была сформулирована принципиально новая модель нейтральной индукции в раннем развитии амфибий, получившая название “модель нейтрального уклонения” (neural default model) (см. следующий раздел).

Нейтральная индукция: модели и механизмы

Среди современных спекуляций о механизмах нейтральной индукции лидирующую позицию занимает “модель нейтрального уклонения”. Суть соответствующих логических построений состоит в следующем. Эктодерма ранней гастрюлы амфибий вследствие неясных пока механизмов детерминирована к дифференцировке в эпидермис. Если нарушить процесс эпидермальной дифференцировки (диссоциация эктодермы на одиночные клетки, инактивация рецепторов активина и (или) BMPs и т.п.), то эктодерма как бы выскальзывает из-под эпидермального контроля и способна “воспринять” иной, нейтральный путь развития. Согласно этой модели нейтрализующие факторы, поступающие к эктодерме от шпеманновского “организатора”, в зоне своей наивысшей локальной концентрации нарушают процесс эпидермализации эктодермы и “предписывают” ей нейтральный путь развития.

Возможно, что обнаруженное многообразие нейтральных индукторов-активаторов связано с реализацией этих двух функций: одни агенты, действуя в относительно высоких концентрациях, связывают факторы эпидермальной дифференцировки и (или) инактивируют их клеточные рецепторы; другие агенты при относительно низких концентрациях индуцируют эктодермальные клетки, “освободившиеся” от эпидермального контроля, к нейтральному пути развития. При желании эту схему можно усложнить, введя в нее критерии компетенции эктодермы к эпидермализующим (нейтрализующим) воздействиям, а также временные и пространственные векторы соответствующих процессов.

Мы, однако, предпочитаем обсудить не детали, а общий принцип “модели нейтрального уклонения” эктодермы. Согласно модели принцип “уклонения” (выскальзывания из-под предшествующего контроля) рассматривается как будущая потенция, которая может быть адаптиро-

вана клеткой, если изолировать ее от предшествующих внеклеточных сигналов. В нашем конкретном случае образование презумптивной нервной ткани должно трактоваться как “уклонение” клеток эктодермы гастрюлы от эпидермального пути дифференцировки (“выскальзывание” из-под эпидермально-предписывающего контроля) и адаптация таких клеток к нейральному пути развития.

Что скрывается за столь неопределенным термином, как “адаптация”? Означает ли это, что клетки эктодермы, следуя по эпидермальному пути, сохраняют за собой право на иную, в данном случае нейральную дифференцировочную судьбу, или же для выхода в нейрогенез они нуждаются в дополнительных, внешних инструктивных нейрализирующих воздействиях? Четких ответов на эти вопросы пока не получено.

Наиболее распространенная точка зрения: основная функция нейральных индукторов шпеманновского “организатора” заключается в ингибировании эпидермального развития эктодермы, что является достаточным условием для вступления клеток на путь нейральной дифференцировки. При этом упускается из вида, что эксплантаты эктодермы гастрюлы амфибий способны к нейрализации при:

1) сохранении клеточных контактов (аксолотли);

2) изменении свойств поверхностных мембран эктодермальных клеток под действием некоторых лектинов (конканавалин А, фитогемаглютинин);

3) активации внутриклеточных протеин-киназ и аденил-циклаз.

Трудно поверить в то, что во всех этих случаях в основе нейрализации эктодермы лежит один и тот же механизм исходного ингибирования эпидермального развития эктодермы, после чего ее клетки “самостоятельно” выходят в нейральную дифференцировку.

Здесь представляется уместным сделать еще один экскурс в классическую, “домолекулярную” эмбриологию. Давно было продемонстрировано, что эктодермальные эксплантаты при культивировании в неоптимальных условиях (экстремальные значения рН, гипо- или гипертонические среды) или в присутствии веществ, оказывающих токсическое действие, превращаются в нервную ткань. Это привело к предположению о том, что в эктодерме гастрюлы амфибий имеются клетки, содержащие нейрализирующие факторы в неактивной форме. При ряде неспецифических воздействий эти эндогенные факторы могут активироваться и вызывать нейрализацию эктодермальных клеток по механизму ауто- и (или) паракриной регуляции.

Действительно имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о присутствии в эктодерме гастрюлы амфибий эндогенных факторов с нейрализирующей активностью. Предположение о паракрином механизме трансмиссии нейрализирующих сигналов в эктодерме подтверждается способностью уже нейрализованных клеток оказывать нейроиндуцирующее действие на соседние с ними клетки эктодермы. Возможно, что диссоциация эксплантатов на отдельные клетки и (или) ингибирование факторов эпидермальной дифференцировки приводит к активации эндогенных нейрализирующих факторов в эктодерме.

Представления о присутствии в эктодерме эндогенных нейрализирующих фактов подразумевают наличие на плазматической мембране эктодермальных клеток соответствующих рецепторов. Логично предположить, что только активация этих рецепторов может быть достаточна для вступления клеток на путь нейральной дифференцировки. К сожалению, эта гипотеза пока не подвергалась экспериментальной проверке.

Хотя нейральная индукция формально интерпретируется как процесс, в эксперименте этот же феномен воспринимается как одномоментная акция, без учета предшествующей “эмбриональной истории” клеток, секретирующих и воспринимающих нейрализирующие сигналы. На самом деле, нейральная индукция представляет собой только часть молекулярно-клеточных акций сложного, многоступенчатого процесса нейральной детерминации эктодермальных клеток в эмбриональном развитии. Во всяком случае, у амфибий будущий нейральный препаттерн намечается до гастрюляции.

Соображения о том, что у позвоночных эктодерма “наследственно” преддетерминирована к нейральному пути развития за счет гипотетических материнских “детерминант” оплодотворенного яйца, не нашли достаточного экспериментального подтверждения. Напротив, выявляется все больше данных, свидетельствующих о постепенном процессе коммитирования эктодермы к нейрогенезу в раннем развитии, вплоть до момента, когда часть ее клеток необратимо детерминируются к нейральной дифференцировке. В нормальном развитии завершающие этапы нейральной детерминации приходятся на стадии поздней бластулы – ранней гастрюлы и находятся под контролем молекулярных сигналов, поступающих в эктодерму от шпеманновского “организатора”.

Нейральная индукция: сравнительные аспекты

Посмотрим, насколько сходны процессы нейральной индукции у амфибий с процессами нейральной детерминации у других животных. Эмбриональные зачатки, функционально аналогичные шпеманновскому “организатору” амфибий, были идентифицированы у других позвоночных животных, на основании способности таких образований индуцировать вторичный осевой комплекс в эмбриональной эктодерме (рис. 3.4).

У куриных зародышей серповидная полоска Коллера (Koller sickle) и гензеновский узелок (Hensen node), расположенный в переднем отделе так называемой “первичной полоски”, обладают индуцирующими активностями, сходными с таковыми шпеманновского “организатора” амфибий (рис. 3.5). Более того, совмещение *in vitro* гензеновского узелка с эктодермой гастрюлы амфибий приводит к образованию в последней вторичного осевого комплекса с нервной тканью. Это указывало на возможное сходство соответствующих сигнальных молекул, секретируемых “организаторами” амфибий и птиц. И действительно, одним из факторов, секретируемых гензеновским узелком, оказался FGF, кото-

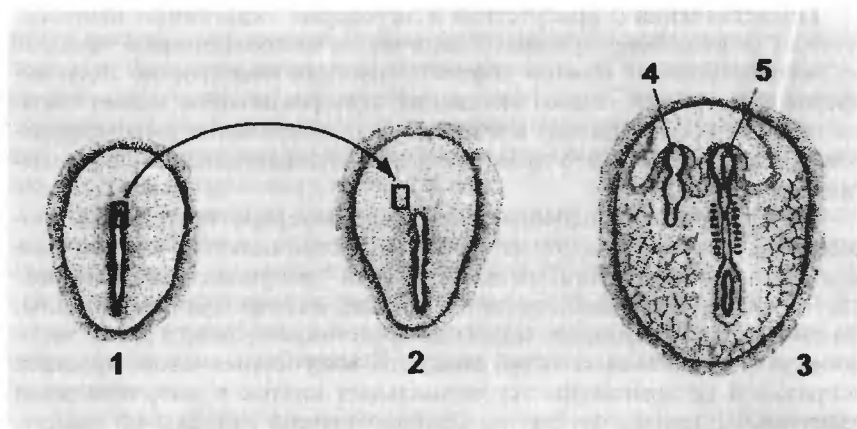


Рис. 3.4. Схема опытов по пересадке гензеновского узелка у зародышей птиц (из: Gilbert S., 1997; изменено).

Гензеновский узелок (1) зародыша утки имплантировали в эмбриональную эктодерму (так называемый “эпибласт”) куриного зародыша (2) на стадии гастрюлы. Через несколько часов развития в эктодерме зародыша-реципиента наблюдали образование двух осевых комплексов: полностью сформированного хозяйского (5) и дополнительного (4), состоящего, как правило, из нервной трубки.

рый вызывал нейрализацию эксплантатов эктодермы (эпибласт) ранних куриных зародышей. Напомним, что такие же факторы синтезируются в шпеманновском “организаторе” и способны при определенных условиях индуцировать нейральную дифференцировку в эктодерме гастрюлы амфибий.

Еще одним фактором, проявляющим нейрализующую активность по отношению к эктодерме куриных зародышей, оказался так называемый “фактор роста гепатоцитов” (Hepatocyte Growth Factor – HGF). Этот фактор был выделен из сыворотки крови взрослых животных на основании его способности стимулировать синтез ДНК в гепатоцитах. HGF сходен с сывороточной серин-содержащей протеазой (плазминоген), но в отличие от последней лишен какой-либо протеолитической активности. Другая интересная характеристика HGF заключается в его способности провоцировать высвобождение клеток из эпителиальных пластов у взрослых животных. Между тем аналогичный процесс имеет место при морфогенетических перестройках у ранних куриных зародышей, что и спровоцировало исследование функций HGF в развитии.

У куриных зародышей HGF экспрессируется в первичной полоске и гензеновском узелке; подсадка под эмбриональную эктодерму HGF-содержащих гранул или HGF-синтезирующих клеток вызывала образование множественных дополнительных осевых комплексов с нервной тканью. При использовании в качестве ткани-мишени экстраэмбриональной эктодермы (т.е. ткани, которая в нормальном развитии не участву-

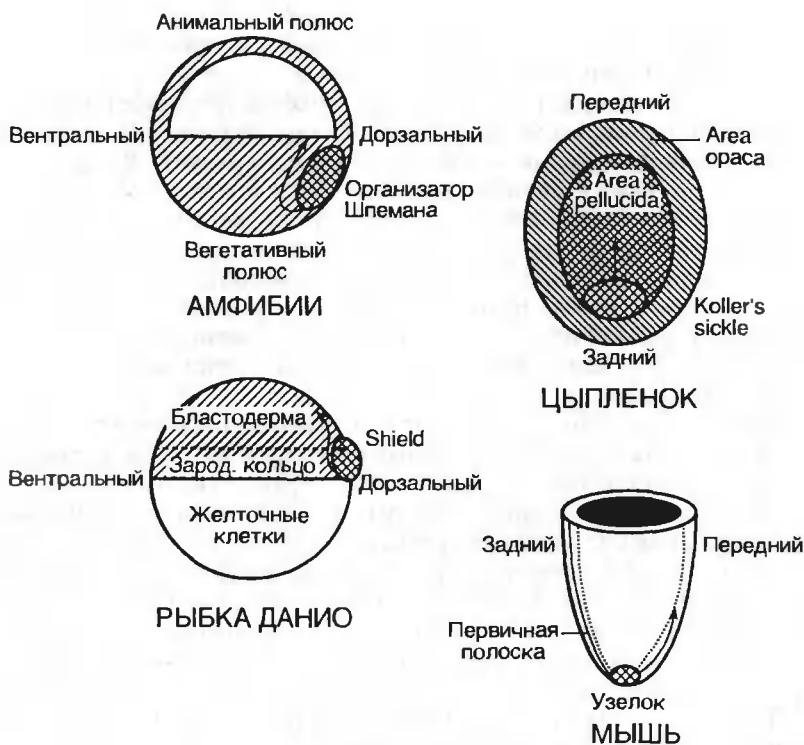


Рис. 3.5. “Организатор” амфибий и функционально-сходные образования у зародышей рыб, птиц и млекопитающих (из: Lemaire, Kodjabachian, 1996: изменено).

На стадии ранней гаструлы зародыши амфибий и рыб имеют сферическую форму, зародыш кур уплощен и как бы распластан по поверхности желтка, а зародыш мышей имеет чашкообразный внешний вид. Перекрестно-заштрихованные овальные кружки – области расположения “организатора”; стрелки указывают направление миграции клеток “организатора” в процессе гаструляции.

ет в нейрогенезе) было показано, что HGF характеризуется только нейтрализующими эффектами (активация нейроспецифических генов, индукция образования нейронов с аксонами и т.д.). Таким образом, можно рассматривать этот фактор как один из вероятных претендентов на роль нейтрализующих агентов “организатора” кур.

Однако тестирование HGF с использованием эксплантатов эктодермы ранней гаструлы нескольких видов амфибий не обнаружило какого-либо нейтрализующего эффекта. Следовательно, функциональное сходство “организаторов” амфибий и птиц не означает обязательного подобия соответствующих нейтрализующих сигнальных молекул.

Данные о нейтрализующих факторах “организатора” у млекопитающих ограничиваются указанием на секретируемый фактор нодел (nodal), относящийся к семейству TGFs; он необходим для формирования первич-

ной полоски у мышинных зародышей. Интересно, что экспериментально спровоцированная гиперэкспрессия гена *nodal* в ранних зародышах рыб приводит к индукции дополнительных осевых комплексов.

Гомеобокс-содержащий ген *Lim-1*, который принимает участие в индукции головных структур у амфибий, характеризуется, по-видимому, сходными функциями и в раннем развитии мышей. У зародышей мышей были также идентифицированы FGFs и фоллистатин, участвующие в процессах нейрализации эктодермы гастролы амфибий. Однако у мышей, нокаутированных по *FGF*-генам, наблюдали нормальное развитие первичной полоски и нервной системы, а погибали такие эмбрионы в результате глубоких нарушений в процессе формирования печени и плаценты. Сходным образом, инактивация фоллистатина не вызывала никаких патологических изменений в развивающейся нервной ткани у зародышей мышей.

У рыб, функциональным гомологом шпеманновского “организатора” является так называемый “зародышевый щиток”, способный к индукции вторичного осевого комплекса с нервной тканью; молекулярные факторы, вызывающие нейрализацию клеток бластодермы зародышей рыб, пока не идентифицированы.

Таким образом, функции “организатора”, наиболее полно исследованные на зародышах амфибий, являются, по-видимому, универсальными для многих видов позвоночных. Это, однако, не означает структурного тождества всех соответствующих молекулярных медиаторов индукционных взаимодействий.

Тот, кто не пожалеет времени и внимательно прочтет эту главу, увидит, что проблема нейральной индукции еще “не вышла из экспериментальных пеленок”. Пока мы вынуждены только описывать контуры модели, что не позволяет говорить с уверенностью об универсальных механизмах и принципах ее функционирования. Наиболее полно охарактеризованы процессы нейральной индукции у зародышей амфибий. Попытки экстраполяции данных на другие виды животных встречают затруднения, связанные с отсутствием информации.

Обилие “белых пятен” не позволяет также предложить сколь угодно серьезную теоретическую интерпретацию процессов нейральной индукции в рамках современной генетики развития. Стараясь восполнить эти пробелы, мы попытались представить читателю логику исследований по нейральной индукции во второй половине XX века, в надежде передать “эстафетную палочку” будущей генерации отечественных биологов развития. Именно поэтому в тексте так много фотографий исследователей, которые в прошлом внесли значительный вклад в развитие теоретических представлений о механизмах нейральной индукции.

Интерес к проблемам эмбриональной индукции увеличивается с каждым годом и все большее число исследователей начинает работать в этой области. Среди них есть немало блестящих имен, которые читатель встретит в рекомендуемых ниже монографиях и обзорных статьях.

ЛИТЕРАТУРА

- Михайлов А.Т.* Морфогены: Экспериментальная иллюзия или реальность // Онтогенез. 1984. Т. 15, № 6. С. 563–584.
- Михайлов А.Т.* Эмбриональные индукторы. М.: Наука, 1988. 216 с.
- Михайлов А.Т.* Факторы нейральной детерминации в раннем развитии амфибий // Механизмы детерминации. М.: Наука, 1990. С. 107–130.
- Саксен Л., Тойвоонен С.* Первичная эмбриональная индукция. М.: Изд-во иностр. лит., 1963. 343 с.
- Тидеманн Х., Грунц Х., Кнехель В., Тидеманн Х.* Индуцирующие факторы и молекулярные механизмы дифференцировки у ранних зародышей амфибий // Онтогенез. 1993. Т. 24, № 1. С. 5–27.
- Gilbert S.* Developmental biology 5th ed. Massachusetts: Sinauer, 1997. 960 p.
- Grunz H.* Neural induction in amphibians // Current topics in developmental biology. San Diego, 1997. P. 191–228.
- Lemaire P., Kodjabachian L.* The vertebrate organizer: Structure and molecules // Trends Genet. 1996. Vol. 12, N 12. P. 525–531.
- Saxen L.* Neural induction // Intern. J. Develop. Biol. 1989. Vol. 33. P. 21–48.
- Slack J.M.W.* From egg to embryo: Regional specification in early development / Ed. P.W. Barlow et al. Cambridge: Univ. press, 1991. 328 p.
- Spemann H., Mangold H.* Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren // W. Roux's Arch. Entwicklungsmech. Organism. 1924. Bd. 100. S. 599–638.

ПЕРВИЧНАЯ РЕГИОНАЛИЗАЦИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ: МОДЕЛИ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ И МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ГРАДИЕНТЫ

Центральная нервная система позвоночных состоит из нескольких отделов, каждый из которых включает разнообразные типы специализированных нейронов и поддерживающих клеток, формирующих динамичные морфо-функциональные и операционно-ассоциативные связи. По уровню структурной организации, операционной памяти и аналитическим потенциалам центральная нервная система намного превышает аналогичные параметры самого современного и мощного компьютера. Каким образом столь сложно организованная многокомпонентная система возникает в процессе эмбрионального развития из простого однослойного нейроэпителия?

Паттерн формирования и пространственной организации нервной системы создается постепенно в процессе раннего развития. Процессы первичной регионализации нервной системы, заключающегося в пространственной “разметке” будущих морфологически-функциональных отделов в пределах гомогенного нейрального зачатка, являются непосредственным продолжением нейральной индукции (см. гл. 4). Если оставить в стороне определенную предрасположенность презумптивной (т.е. будущей) нейроэктодермы гастрюлы к превращению в нервный зачаток, то можно считать, что нейральная индукция со стороны хордомезодермы (так называемый “организатор”) является первым актом, определяющим общий контур пространственной организации нервной системы в развитии позвоночных.

В процессе гастрюляции сигналы, поступающие в эмбриональную эктодерму от подлежащего зачатка хордомезодермы (“организатора”), отменяет эпидермальную дифференцировку эктодермальных клеток и предписывает им нейральный путь развития. Более того, “организатор” участвует в определении осевой полярности и размеров первичного нейрального зачатка, называемого нервной пластинкой (см. рис. 4.1). Данные описательной и экспериментальной эмбриологии свидетельствовали о том, что уже в конце гастрюляции различные области нервной пластинки характеризуются различными дифференцировочными потенциалами, “размещенными” в определенном порядке вдоль ее передне-задней оси. Так, при культивировании *in vitro* наиболее передние фрагменты нервной пластинки формируют передний и средний мозг, срединные ее области превращаются в заднемозговые структуры, в то время как наиболее задние зоны нервной пластинки образуют нервные трубки (спинной мозг).

Какие механизмы определяют пространственную компартиментализацию нейрального зачатка на соответствующие отделы или, другими словами, каким образом в пределах нервной пластинки возникает, ста-

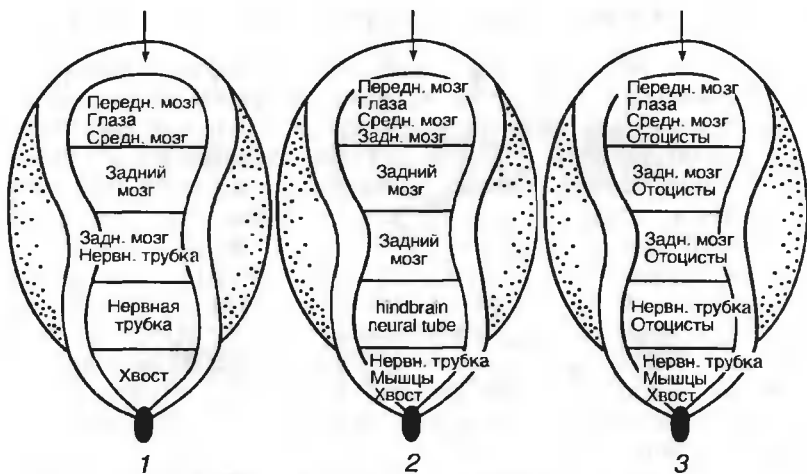


Рис. 4.1. Схема пространственного распределения нейральных потенциалов в нервной пластинке (стрелки) зародышей амфибий (по: Slack, Tannahill, 1992, изменено).

1 – дифференцировочная судьба разных отделов нервной пластинки в нормальном развитии; 2 – структуры, формирующиеся при изоляции и культивировании фрагментов нервной пластинки (т.е. способность разных отделов нервной пластинки к самостоятельному развитию); 3 – влияния, которые оказывают фрагменты нервной пластинки при воздействии на эквипотенциальную (тотипотентную) эктодерму ранней гастулы (эти данные указывают на то, что каждая зона нервной пластинки содержит гипотетические факторы, способные индуцировать в компетентной эктодерме разнообразные нейральные структуры). В общем наблюдается соответствие дифференцировочных потенциалов и способности к так называемому самостоятельному развитию разных отделов нервной пластинки вдоль ее передне-задней оси.

билизируется и реализуется план последующей морфо-функциональной регионализации центральной нервной системы? Настоящая глава представляет попытку ответить на эти вопросы в первом приближении, так как мы еще очень далеки от понимания истинных механизмов этих сложных морфогенетических процессов.

В настоящее время процессы первичной регионализации нервной пластинки исследуются с использованием зародышей многих видов позвоночных животных. Ранее, однако, предпочтение отдавалось зародышам амфибий, и поэтому неудивительно, что соответствующие обширные данные до сих пор служат отправной точкой при планировании опытов на других модельных объектах. В последние 10–15 лет внедрение в экспериментальную эмбриологию методических приемов молекулярной генетики способствовало прогрессу в идентификации молекулярных посредников процессов нейральной регионализации. Парадоксально, что основные теоретические представления о механизмах первичной регионализации нервной системы, сформулированные в 60-х годах XX в., остаются пока неизменными (или подвергаются не принципиальным модификациям).

Регионализация нейроэктодермы: гипотезы и модели

Считается общепризнанным, что регионализация (patterning) нейроэктодермального зачатка определяется в основном его взаимодействиями с подлежащей дорзальной мезодермой (так называемая “крыша первичной кишки”, или archenteron roof) и в меньшей степени с окружающим эпидермисом. Возможны три основных варианта, объединяющие многие вероятные механизмы регионализации нейроэктодермы.

Первый вариант основывается на предположении о том, что нейроэпителий уже имеет “собственный” план (программу) будущей регионализации. Иначе говоря, морфогенетическая и дифференцировочная судьба различных областей нейроэпителиального пласта определены заранее и для реализации соответствующих потенциалов каждая из них нуждается только в разрешающих (так называемых пермиссивных) сигналах, поступающих от дорзальной мезодермы в процессе нейроуляции.

Альтернативный вариант подразумевает дифференцировочную однородность (так называемую “нейральную тотипотентность”) всей нервной пластинки. В этом случае ее последующая регионализация может определяться качественно различными сигналами, поступающими из разных отделов дорзальной мезодермы. При этом очевидно, что регионализация нейроэктодермы будет определяться пространственной компартиментализацией дорзальной мезодермы, каждый отдел которой должен секретировать разные сигнальные молекулы, вызывающие формирование в нейроэктодерме или переднего, или среднего, или заднего, или спинного мозга.

Наконец, возможен компромиссный вариант, базирующийся на представлении о существовании в мезодерме двух типов сигнальных молекул: “переднеголового” и “заднеголового” индукторов. Эти гипотетические индукторы должны формировать (вдоль переднезадней оси дорзальной мезодермы) два оппозитные концентрационные градиента. Только при этом условии будет достигнуто корректное “размещение” соответствующих мозговых компартиментов вдоль переднезадней оси нейроэпителиального пласта.

Как будет показано, ни один из предшествующих выше вариантов не отражает в “чистом виде” реальные ситуации, имеющие место в раннем эмбриональном развитии нервной системы. Скорее можно говорить о преобладании того или иного механизма в процессах регионализации нейроэпителия у разных видов животных. Тем не менее, общим элементом всех моделей является наличие морфогенетических сигналов, поступающих в нейроэктодерму из дорзальной мезодермы.

Презумптивная нейроэктодерма характеризуется определенной “предрасположенностью” к формированию того или иного отдела нервной системы, по крайней мере на молекулярном уровне, однако такой молекулярный “пре-паттерн” не является жестко зафиксированным и судьба того или иного отдела нейроэктодермы может быть экспериментально изменена. Таким образом, можно предполагать, что способность нейроэктодермального пласта к так называемой ауторегионали-

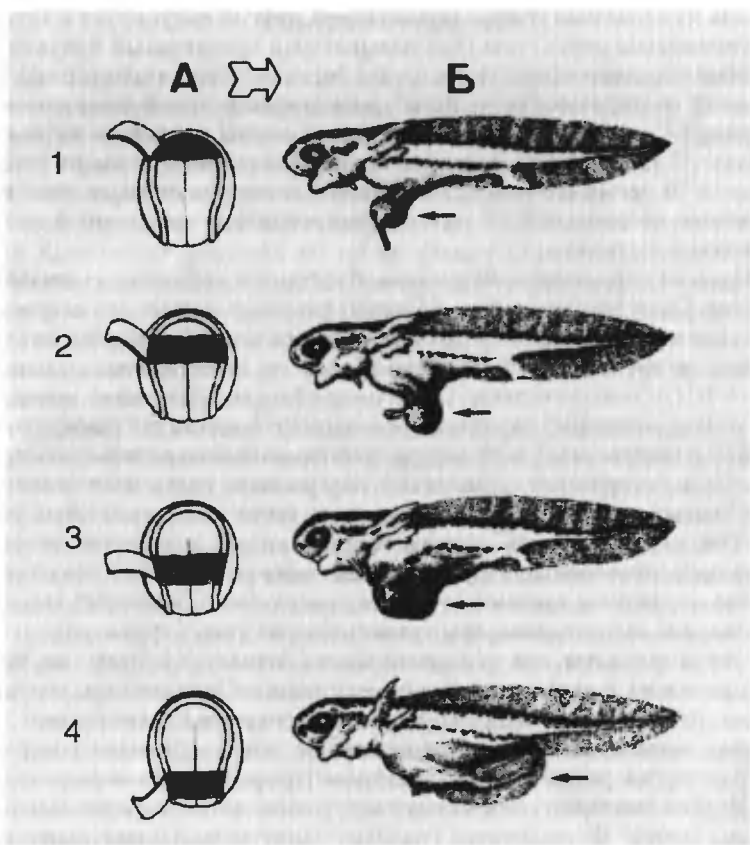


Рис. 4.2. Опыты О. Мангольд: регионально-специфичная индуцирующая активность дорсальной мезодермы (“организатора”) у зародышей амфибий на стадии поздней гастрюлы – ранней нейрулы (по: Gilbert, Saxen. 1993; изменено).

Вдоль передне-задней оси тела зародыша-донора (А), отсепаровывали разные зоны нервной пластинки и вырезали соответствующие фрагменты (на рисунке отмечены черным цветом) подлежащей дорсальной мезодермы. Фрагменты дорсальной эктодермы подсаживали под эктодерму зародышей-реципиентов на стадии ранней гастрюлы. Спустя несколько дней у зародышей-реципиентов наблюдали развитые “вторичных комплексов” (стрелки), содержащих: головы с балансерами (1), головы с балансерами, передним мозгом и глазами (2), задне-головные структуры (3), туловищно-хвостовые структуры (4).

зации играет лишь дополнительную роль в процессах первичной компартиментализации нервной системы.

Другие модели нейральной регионализации основываются на качественно различных инструктивных (“директивных”) сигналах, поступающих в эктодерму от дорсальной мезодермы. Еще Ганс Шпеманн (автор открытия феномена эмбриональной индукции; см. гл. 4) предпологал, что “организатор” (зачаток хордомезодермы) содержит два индуктора. Один из них вызывает образование в эктодерме головных струк-

тур (так называемый головной индуктор), другой индуцирует в эктодерме туловищные структуры (так называемый туловищный индуктор). У амфибий на стадии ранней гаструлы “организатор” характеризуется в основном свойствами “головного”, а на стадии поздней гаструлы – “туловищного” индуктора. Напомню, что на стадии ранней гаструлы “организатор” действует на эктодермальные клетки, побуждая их к нейрогенезу, в то время как на стадии поздней гаструлы он оказывает индуцирующие воздействия на уже сформированный нейральный зачаток (нервную пластинку).

Один из сотрудников Шпеманна, блестящий экспериментальный эмбриолог, Отто Мангольд (Otto Mangold) детально исследовал индуцирующую активность различных областей “организатора” амфибий на стадии поздней гаструлы–ранней нейрулы и получил любопытные результаты (рис. 4.2). Он имплантировал различные области дорзальной мезодермы нейрулы под эктодерму зародышей-реципиентов на стадии ранней гаструлы. Как и ожидалось, у всех зародышей-реципиентов развивались дополнительные “вторичные комплексы”, содержащие различные ткани и органы, однако характер дифференцировки таких комплексов был различен. Так, самые передние отделы “организатора” индуцировали в эктодерме переднеголовые структуры с балансерами, средние его отделы – головы с мозгом и глазами, а задние отделы “организатора” вызывали образование задне-головных и туловищно-хвостовых структур.

Эти результаты, как это почти всегда случается в биологии, интерпретировались с двух полярных точек зрения. Одни исследователи полагали, что разные области дорзальной мезодермы секретируют качественно различные сигнальные молекулы, что и приводит в нормальном развитии к регионализации нейроэктодермы вдоль передне-задней оси. Другие считали, что к концу гаструляции вдоль переднезадней оси “организатора” формируется градиент единственного индуктора и что клетки нейроэктодермы способны по-разному реагировать на различные его концентрации. Как мы увидим в дальнейшем, различия между этими двумя точками зрения оказались менее противоречивыми, чем представлялось в начале.

Группа финских эмбриологов, возглавляемая Суло Тойвоненом (Sulo Toivonen; см. гл. 4), представила достаточно весомые экспериментальные доказательства присутствия в дорзальной мезодерме, по крайней мере, двух типов сигнальных молекул, способных вызвать образование в компетентной эктодерме или головных, или туловищных структур. Более того, ряд полученных ими данных косвенно свидетельствовал о неравномерном (градиентном?) распределении таких индукторов вдоль переднезадней оси дорзальной мезодермы.

Но что самое главное, – все чаще стали высказываться предположения о том, что клетки нейроэпителиального пласта способны дифференцироваться в различных направлениях в зависимости от полученной ими “дозы” одного и того же индуктора. Соответственно, в эмбриологии позвоночных все чаще и чаще стал употребляться термин “морфоген”, объединяющий качественную и количественную характеристики действия эмбриональных индукторов.

Что такое морфоген?

По определению, *морфоген* – это индуктор, который способен по-разному определять дифференцировочную судьбу многих клеток-мишеней, находящихся в зоне градиента его эффективных концентраций. Таким образом, действие на расстоянии от места синтеза (секреции) – основная характеристика морфологической активности. Действительно, если индуктор активен только на расстоянии, не превышающем один клеточный диаметр, то он не может определять судьбу других (удаленных от него) клеток воспринимающего зачатка. Очевидно также, что морфогены – это секретируемые и способные к диффузии молекулы. Вероятнее всего, диффузия морфогена является пассивным процессом, что и приводит к формированию в тканях так называемых морфогенетических градиентов.

Морфогенетический градиент является терминологическим определением, приложимым к любой ситуации, при которой клетка или группа клеток-индукторов секретирует сигнальные факторы, диффундирующие в окружающую клеточную среду, что сопровождается постепенным понижением их концентрации по мере удаления от источника их синтеза и(или) секреции. **Наиболее важным моментом, однако, является, способность окружающих клеток воспринимать разные концентрации морфогена как различные информационные сигналы.** В результате градиент единичного морфогена может привести к формированию в исходно гомогенной клеточной массе нескольких субпопуляций, запрограммированных к различным дифференцировкам. Причем такое дифференцированное программирование будет иметь определенную и закономерную пространственную ориентацию в пределах воспринимающего клеточного поля в зависимости от профиля морфогенетического градиента.

Таким образом, единичная акция в развитии, заключающаяся в кратковременной и локальной секреции только одного морфогена, может иметь далеко идущие последствия в других тканях, вызывая в них пространственно закономерное размещение различных дифференцировок. В результате различные типы клеток могут формироваться в нужном месте в результате изменения концентрации одного и того же морфогена.

Хотя существование морфогенов предполагалось очень давно, молекулы с соответствующими свойствами были идентифицированы в развитии позвоночных лишь в конце XX в. Большая заслуга в исследовании механизмов действия морфогенов в раннем развитии позвоночных принадлежит известному английскому эмбриологу Джону Гёрдону (John Gurdon). Используя мезодермализующий фактор – активин, он разработал и предложил несколько молекулярно-клеточных моделей, позволяющих исследовать закономерности функционирования морфогенов в раннем эмбриональном развитии. Оказалось, что клетки эмбриональной эктодермы способны: (1) детектировать очень низкие концентрации морфогена (менее 20 пикограмм); (2) различать всего лишь двукратное изменение концентрации морфогена, активируя две совершен-



Профессор Джон Гёрдон (1-й конгресс биологов развития Испании, Университет Страны Басков, декабрь 1996). Профессор Дж. Гёрдон оказал влияние на формирование многих направлений современной биологии развития. Значительно улучшив методику пересадки ядер в яйцеклетки, он первым в мире получил жизнеспособных клональных амфибий, показав тем самым принципиальную возможность использования этой идеологии применительно к другим видам животных. В области молекулярной биологии развития он также оставил значительный след, исследуя факторы, регулирующие работу генов в раннем эмбриогенезе. В области молекулярных механизмов эмбриональной индукции, именно он впервые теоретически обосновал и экспериментально

продемонстрировал как функционируют морфогены у зародышей позвоночных. Его вклад в биологию развития был отмечен многими престижными международными премиями. В период с 1987 по 1995 г. он являлся президентом Международного общества биологов развития (МОБР). В настоящее время Дж. Гёрдон – директор Института рака и биологии развития при Университете в Кембридже.

но разные программы дифференцировки, соответственно: (3) не только избирательно активировать, но и репрессировать наборы генов в одних и тех же клетках-мишенях в зависимости от положения последних в морфогенетическом градиенте. Скорость распределения морфогенов в эмбриональной эктодерме позвоночных составляет около 10 клеточных диаметров за несколько часов.

В эмбриональном развитии позвоночных градиенты морфогенов играют ведущую роль в регионализации мезодермы и нейроэктодермы.

Регионализация нейроэктодермы: двухградиентная морфогенетическая модель

В начале 50-х годов два финских эмбриолога, Суло Тойвонен и Лари Саксен (см. гл. 4) предложили оригинальную двухградиентную модель первичной регионализации нервной пластинки в развитии амфибий. Проверка временем показала, что эта модель не только не противоречит, но во многом совпадает с реальными процессами.

Двухградиентная модель нейральной регионализации объединяла постулаты классической идеологии химических градиентов с ответными реакциями эмбриональных клеток, воспринимающих морфогенетические сигналы. Согласно этой модели индуцирующие влияния дор-

зальной мезодермы приводят к формированию в нервной пластинке градиентов двух морфогенов: нейтрализующего и мезодермализующего (рис. 4.3). Нейтрализующий фактор формирует симметрично изменяющийся градиент вдоль дорзо-вентральной оси нервного зачатка (с максимумом в срединно-дорзальной зоне). Такой градиентный профиль поддерживается практически неизменным по всей длине нервной пластинки. Напротив, мезодермализующий фактор формирует концентрационный градиент вдоль переднезадней оси нервной пластинки, с максимумом в задней ее области. Градиент мезодермализующего фактора “обрывается” на уровне переднего отдела нервной пластинки.

В соответствии с этими представлениями каждый из основных отделов будущей центральной нервной системы детерминирован к развитию под влиянием разных соотношений нейтрализующего и мезодермализующего индукторов. Избыток нейтрализующего фактора на фоне незначительной концентрации мезодермализующего индуктора должен был провоцировать образование переднего и среднего мозга. При эквимолярных соотношениях обоих факторов должны формироваться заднемозговые структуры. В зоне явного избытка мезодермализующего индуктора ожидалось получить образование нервной трубки (спинного мозга). Нетрудно заметить, что в рамках этой модели регионализация нервной системы определяется в основном градиентом мезодермализующего фактора, под действием которого “изначальная” переднемозговая детерминация всей нервной пластинки постепенно сменяется (вдоль ее переднезадней оси) на средне- и заднемозговые типы коммитирования нейтральных клеток.

Поскольку в те годы молекулярные морфогены еще не были идентифицированы, проверка гипотезы базировалась на непрямых данных, полученных с помощью оригинальных эмбриологических манипуляций. Исходно требовалось получить доступ к тканям, проявляющим только нейтрализующее или только мезодермализующее действие на эктодерму ранних зародышей амфибий. Это оказалось возможным благодаря упорству и настойчивости С. Тойвонена, который исследовал индуцирующую активность более чем 40 различных тканей и обнаружил две ткани, отвечающие поставленным целям. Затем из этих тканей приготавливались “смеси”, характеризующиеся различным соотношением нейтрализующей и мезодермализующей активностей. Эти “смеси” помещали между двух фрагментов эмбриональной эктодермы и такие сэндвичи культивировали на протяжении нескольких суток. В результате удалось избирательно индуцировать в эктодерме формирование всех основных отделов центральной нервной системы. Итак, первая экспериментальная проверка показала, что двухградиентная модель имеет право на существование.

Между тем, другая группа исследователей, возглавляемая выдающимся голландским эмбриологом Питером Ньюкупо (Peter Nieuwkoop), показала, что процесс пространственной регионализации нервной системы характеризуется определенной временной протяженностью и реализуется в течение нескольких стадий. Вначале (в процессе гаструляции) имеет место так называемая “активация”, кото-

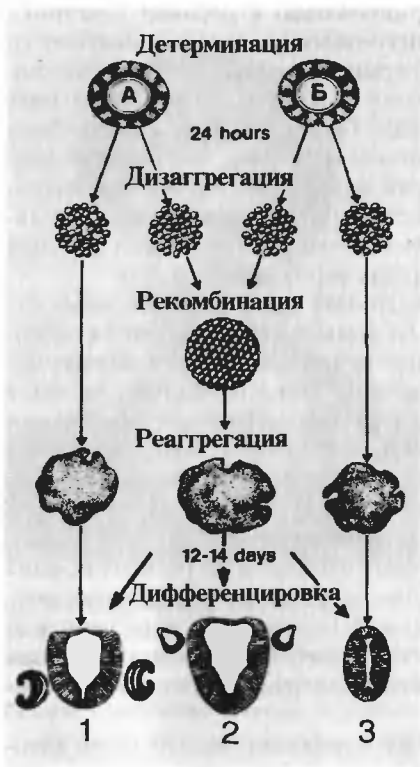


Рис. 4.4. Схема опытов, демонстрирующих, что в развитии нейральная регионализация осуществляется последовательно и включает несколько этапов (по: Gilbert, Saxen, 1993, изменено). “Передне-головной” (А) или “спинно-каудальный” (В) тканевой индуктор помещали между двух фрагментов эктодермы ранней гастрюлы амфибий. После 24-часовой экспозиции индукторы удаляли, а эктодерму дизагрегировали на одиночные клетки. Затем готовили реагрегаты, включающие нейрализованные или мезодермализованные клетки или их смеси в различных пропорциях: 1 – под влиянием “передне-головного” индуктора клетки формировали ткань переднего/среднего мозга с глазами; 2 – под влиянием “спинно-каудального” индуктора клетки формировали нервные трубки (спинной мозг) и хвостовые структуры; 3 – смесь нейрализованных и мезодермализованных клеток давала начало как переднему и спинному мозгу, так и структурам, характерным для заднего мозга, включая слуховые пузырьки. Было сделано заключение, что в процессе нормального развития регионализация нервной системы определяется взаимодействиями ранее нейрализованной эктодермы (в процессе гастрюляции) с дорзальной мезодермой (в процессе нейруляции).

рая приводит к нейрализации всей будущей нейроэктодермы; на этой стадии любая зона нейроэпителия образует при изоляции только переднемозговые структуры. Ответственными за “активацию” эктодермы являются нейрализирующие факторы, секретируемые “организатором” в начале гастрюляции. Позднее (конец гастрюляции–начало нейруляции), средние и задние отделы нейроэктодермы подвергаются так называемым “трансформирующим” влияниям “организатора”, что проявляется в формировании заднемозговых структур и спинного мозга.

Объединение пространственных (градиентных) и временных параметров воздействия “организатора” на эктодерму привело к созданию синтетической модели регионализации нервной системы в раннем эмбриональном развитии. Лаури Саксен, Суло Тойвонен и Тапио Вайнио (Tapio Vainio – талантливый финский исследователь, жизнь которого рано оборвалась в результате автомобильной катастрофы) заключали ткани, характеризующиеся только нейрализующей или только мезодермализующей активностью, в различные эктодермальные сэндвичи. После 24-часовой экспозиции ткани-индукторы удаляли, а эктодермальные сэндвичи диссоциировали на одиночные клетки (рис. 4.4). Из этих суспензий готовили агрегаты, содержащие в разных пропорциях клетки, обработанные ранее нейрализующим или мезодермализующим “индукторами”. Агрегаты клеток, обработанных только нейрализую-

щим тканевым индуктором, формировали, как и ожидалось, только переднемозговые структуры (передний мозг с глазами). Аналогичным образом, клетки, подвергавшиеся только мезодермализующему воздействию, образовывали нервные трубки (т.е. спинной мозг) и хвостовые структуры. Вместе с тем в агрегатах, состоящих из нейтральных и мезодермализованных клеток, обнаруживался весь спектр мозговых структур, а именно: передний мозг с глазами, задний мозг со слуховыми пузырьками и спинномозговые трубки. При умозрительной экстраполяции полученных результатов на процессы нормального развития было сделано заключение, что формирование заднего мозга является вторичным актом и представляет результат взаимодействия между ранее нейтральными клетками и мезодермой. Соответственно, авторы ввели в свою исходную двухградиентную модель нейральной регионализации дополнительный временной параметр. Теперь эта модель подразумевала также двухстадийную последовательность событий: на начальных этапах индукции эмбриональная эктодерма детерминируется к развитию в мезодерму, а затем – в нервную ткань; на завершающих этапах индукции региональная специфика нейрального зачатка определяется взаимодействиями между нейроэпителием и мезодермой.

Эти представления нашли подтверждение во многих других опытах, включая эксперименты на живых зародышах. За исключением отдельных деталей, все экспериментально-эмбриологические опыты по нейральной индукции и нейральной регионализации свидетельствовали в пользу следующей последовательности соответствующих событий в процессе нормального развития. “Организатор” (дорзальная мезодерма) проявляет вначале так называемую “переднемозговую” нейтральную активность и, воздействуя на компетентную эктодерму, приводит к образованию в ней однородного первичного зачатка нервной системы (так называемая активация общей нейральной потенции). Позднее “организатор” характеризуется мезодермализующей индукционной активностью и, воздействуя на уже нейтральную эктодерму, приводит к ее подразделению на области с различными нейральными потенциями (так называемая трансформация нейральных потенций). Региональная специфичность трансформируемых сигналов дорзальной мезодермы достигается благодаря формированию в нервной пластинке градиента мезодермализующего морфогена(ов).

Внедрение в экспериментальную эмбриологию молекулярно-генетических технологий позволило проверить справедливость двухградиентной гипотезы на молекулярном уровне. В ранних гастрюлах амфибий было идентифицировано довольно большое число генов и белковых продуктов, которые синтезируются и секретируются “организатором” и которые вызывают формирование в эмбриональной эктодерме только ткани переднего мозга с глазами (“активация” общей нейральной потенции эктодермальных клеток). Наиболее охарактеризовано действие двух из них: ноггина и хордина (см. гл. 4). Ниже мы остановимся на других факторах “организатора”, характеризующихся способностью к “трансформации” потенций уже нейтральных клеток.

Регионализация нейроэктодермы: факторы, трансформирующие нейральные потенциалы

Среди молекул, синтезируемых и секретируемых “организатором” в конце гаструляции–начале нейруляции, особого внимания заслуживает белковый продукт гомеобокс-содержащего гена *Xhox 3* (это известный *Hox 3* ген, идентифицированный также у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*). На стадии ранней нейрулы этот белок распределен в дорзальной мезодерме (т.е. “организаторе”) в виде концентрационного градиента вдоль переднезадней оси с максимумом в наиболее задних ее отделах.

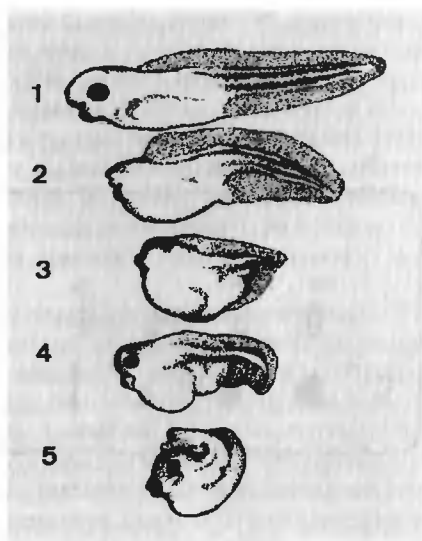
При культивировании *in vitro*, задние области дорзальной мезодермы, содержащие *Xhox 3* в относительно высоких концентрациях, индуцируют в эктодермальных тканевых фрагментах заднемозговые структуры. Напротив, передние отделы дорзальной мезодермы, характеризующиеся низким содержанием этого морфогена, провоцируют эктодермальные эксплантаты к развитию в ткань переднего и(или) среднего мозга. *In vivo* искусственное увеличение концентрации *Xhox 3*, вызванное введением его мРНК в ранние зародыши амфибий, приводит к развитию личинок с редуцированным головным отделом или так называемых безголовых головастиков (рис. 4.5). Напротив, искусственное уменьшение его концентрации в результате введения в зародыши связывающих антител не затрагивает развитие переднеголовных структур, но существенно нарушает формирование спинно-каудальных отделов (включая и спинной мозг) тела личинок. Данные этих опытов предполагают, что белковый продукт гена *Xhox 3* является типичным морфогеном, способным трансформировать потенциалы нейрального зачатка в зависимости от концентрации.

И действительно, переднезадний градиент этого белка был обнаружен не только в “организаторе” (дорзальная мезодерма), но также в нервной пластинке зародышей амфибий. Примечательно, что профиль градиента белка *Xhox 3* в нервной пластинке нормальных зародышей совпадает с таковым для гипотетического мезодермализующего фактора (см. двухградиентную модель нейральной регионализации Саксена–Тойвонена). Более того, этот белок был обнаружен в заднем и среднем, но не в переднем отделе нервной пластинки.

У зародышей амфибий кандидатами на роль возможных агентов, участвующих в процессах “трансформации” нейроэктодермы, являются белки из семейства так называемых “факторов роста фибробластов” (Fibroblast Growth Factors – FGFs). При физиологических концентрациях эти белки практически лишены нейрализующей активности (см. гл. 4), но способны вызывать *in vitro* “трансформацию” переднемозговой ткани в ткань, характерную для заднего и(или) спинного мозга. Механизмы нейротрансформирующего действия FGFs пока неизвестны. Показано только, что эффекты FGFs не связаны с презентацией соответствующих рецепторов на клетках нейроэпителлия. Во всяком случае, экспериментальное инактивирование FGF-рецепторов, достигнутое у трансгенных шпорцевых лягушек, не влияло на нейро-трансформирующую активность этих факторов.

Рис. 4.5. Белковый продукт Xhox 3 гена – молекулярный фактор регионализации нейроэктодермы в раннем развитии амфибий (по: Gilbert, Saxen, 1993, изменено).

1 – контрольный зародыш; 2, 3 – введение в зародыши мРНК Xhox 3 гена приводила к формированию личинок с редуцированным головным отделом или “безголовых” головастика; 4, 5 – введение в зародыши антител, связывающих белковый продукт Xhox 3 гена, вызывала нарушения в развитии туловищно-хвостовых структур.



У зародышей рыб имплантация FGF-содержащих гранул в область будущей нейроэктодермы вызывала значительные морфологические нарушения в развитии переднего мозга, без каких-либо морфологических или молекулярных признаков “трансформации” его ткани в заднемозговые структуры. Можно полагать, что FGFs способны ингибировать реализацию переднемозговых потенциалов нейроэпителиа. Вместе с тем их нейро-трансформирующая активность остается пока под вопросом.

В работах на зародышах многих видов было показано, что некоторые непептидные ростовые факторы, например ретиноиды, вовлечены в процессе первичной регионализации нервной системы.

Ретиноевая кислота (РК) и соответствующие ей рецепторы были обнаружены в зародышах амфибий в процессе гаструляции. *In vitro* обработка эксплантатов эктодермы гаструлы амфибий РК не приводила к развитию в них нейтральных или мезодермальных структур. Тем не менее, инкубация целых зародышей в присутствии РК вызывала избирательное нарушение формирования нервной системы в дозовой зависимости. Если при низких концентрациях экзогенной РК наблюдали только уменьшение размеров передней трети нервной пластинки, то при высоких ее концентрациях у зародышей отсутствовали передний и средний мозг, при сохранении, однако, заднего и спинного мозга. В экстремальных случаях, высокие концентрации экзогенной РК провоцировали развитие “безголовых” личинок.

На молекулярном уровне ранние эффекты РК проявлялись в ингибировании транскрипции генов, специфичных для переднемозговых структур. При этом экспрессия общих нейро-специфичных генов и маркеров, характерных для заднемозговых отделов, не нарушалась (рис. 4.6).

К этому времени уже стало известно, что РК способна активировать разные наборы генов-регуляторов, определяющих формирование общего плана строения тела зародыша в дозовой зависимости. Поэтому

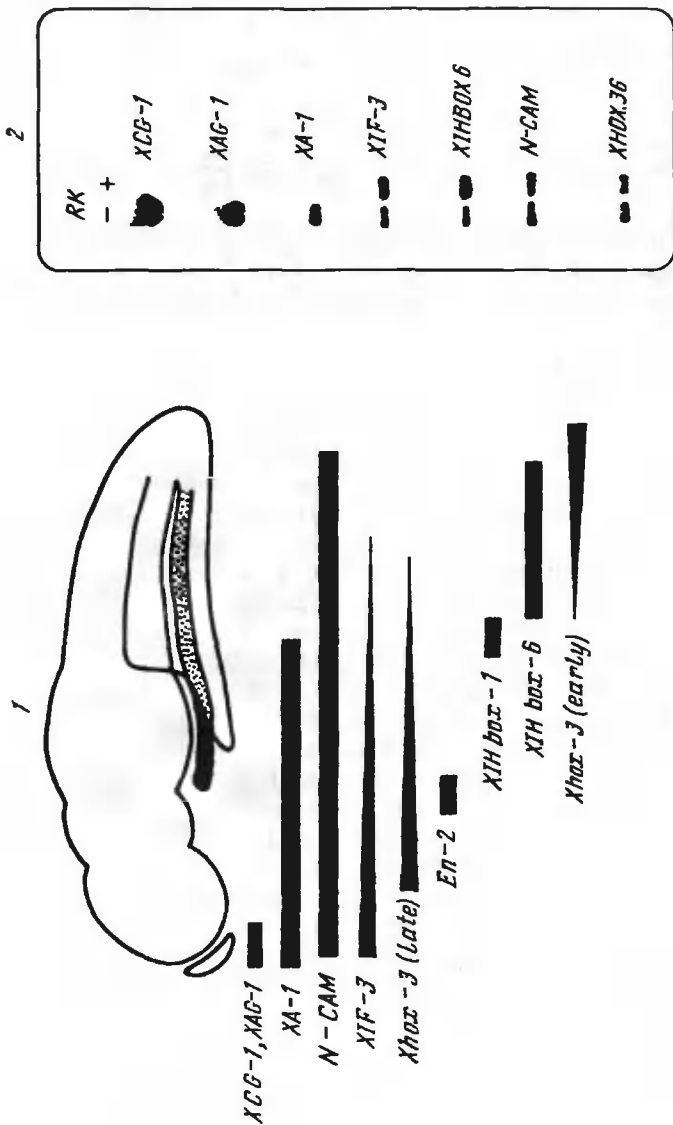


Рис. 4.6. Ингибирование транскрипции генов, специфичных для передне-головных структур зародышей амфибий, под влиянием экзогенной РК (использованы фрагменты рисунков из: 1 – Slack, Tappahill, 1992; 2 – Gilbert, Saxen, 1993).
 1 – схема экспрессии нейроспецифичных генов вдоль передне-задней оси центральной нервной системы зародышей амфибий; 2 – экспрессия нейроспецифичных генов у интактных (-РК) и обработанных РК (+РК) зародышей (данные блот-гибридизации эмбриональных мРНК с соответствующими молекулярными зондами). Экзогенная РК ингибирует транскрипцию "передне-головных" генов (*XCG-1*, *XAG-1*, *XA-1*), усиливает транскрипцию "передне-средне-головного" гена (*XIF-3*) и значительно повышает экспрессию "спинно-мозговых" генов (*XIN box 6*), не затрагивая при этом уровень общего нейрального маркера (*N-CAM*).

появились высказывания, что градиент концентраций РК может контролировать не только общий план строения тела зародыша, но может также детерминировать переднезаднюю регионализацию “организатора” и, соответственно, нейрального зачатка. Первые результаты показали обнадёживающими: введение в ранние зародыши амфибий экзогенной РК (т.е. общее повышение ее концентрации во многих эмбриональных пластах) приводило к развитию уродливых личинок с чрезмерно развитыми туловищно-хвостовыми отделами. Однако ряд сопутствующих эффектов не вписывался в эту привлекательную и простую экспериментальную модель.

Тогда предположили, что нейро-трансформирующие эффекты РК могут быть связаны с ингибированием процессов нейральной индукции. Действительно, оказалось, что “организатор”, выделенный из зародышей, обработанных РК, утрачивал способность к индукции переднемозговых структур в эктодерме гастрюлы амфибий. Казалось, что проблема решена: РК ингибирует нейрализующую активность “организатора” и, как следствие, извращается процесс последующей переднезадней спецификации нервной пластинки (вместо переднего мозга формируются заднемозговые и(или) спинномозговые структуры). Однако в других опытах было показано, что эктодерма, выделенная из зародышей амфибий, обработанных РК, не отвечает на нейрализующие сигналы, секретируемые нормальным (интактным) “организатором”.

Последнее заставило предположить, что РК может влиять на нейральные потенции непосредственно в эктодерме. Добавление РК в культуральную среду с эксплантированной нейроэктодермой амфибий ингибировало развитие в ней переднемозговых структур. Более того, изучение экспрессии маркеров, характерных для различных отделов нервной пластики амфибий, показало, что экзогенная РК провоцирует “смещение” экспрессии генов, специфичной для заднего и спинного мозга, в передние отделы нейрального зачатка. Следует особо подчеркнуть, что исходные молекулярные результаты были получены в аналогичных опытах на зародышах птиц и млекопитающих. Совокупность этих данных позволяет говорить о прямом нейротрансформирующем действии РК в пределах нервной пластинки.

Первичную регионализацию нервной системы нельзя увидеть под микроскопом, точно так же, как, глядя на котлован для фундамента, нельзя представить себе будущее здание (если ты, конечно, не являешься главным конструктором). Первые морфологические контуры будущего головного и спинного мозга начинают проступать на более поздних этапах развития. Однако предварительно нервная пластинка должна сформировать нервную трубку. Сворачивание нервной пластинки – сложный морфогенетический и механо-химический процесс. Этот процесс начинается в области будущего головного мозга и постепенно распространяется на спинной мозг (рис. 4.7). На этих стадиях опытный глаз эмбриолога уже может различить первые морфологические признаки будущих отделов центральной нервной системы. Замыкание нервных валиков (на дорзальной стороне тела зародыша) приводит к формированию внутренней полости центральной нервной системы и к началу

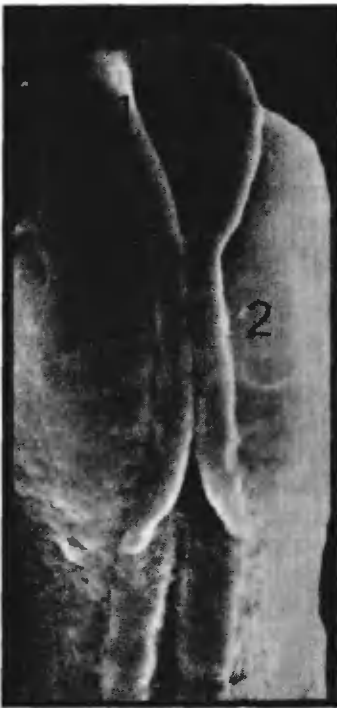


Рис. 4.7. Головная область зародыша кур на стадии 6 сомитов (по: Le Douarin et al., 1998, изменено). Нервные валики (1) уже сомкнуты на уровне среднего отдела головного мозга (2).

процесса компартиментализации ткани нервной трубки вдоль дорзо-вентральной ее оси.

В начале этой главы мы вскользь упомянули о том, что окружающий эпидермис оказывает определенные влияния на процессы регионализации нервной пластинки вдоль ее дорзо-вентральной (!) оси. Посредниками таких эпидермальных дорзо-вентральных нейротрансформирующих воздействий являются, вероятно, так называемые “морфогенетические белки кости” (Bone Morphogenetic Proteins – BMPs), относящиеся к суперсемейству “трансформирующих факторов роста” (Transforming Growth Factors). Напомним, что у зародышей амфибий BMPs являются эпидермальными морфогенами и препятствуют

нейрализации эктодермы ранней гастролы (см. гл. 4). Эти факторы продолжают экспрессироваться в поверхностном (дорзальном!) эктодермальном эпителии и в период нейруляции. При действии на эксплантаты раннего нейроэпителия эти факторы индуцируют транскрипцию в нем дорзо-специфических нейральных генов.

Хотя представления о механизмах первичной регионализации нервной системы базируются, как правило, на моделях с обязательным участием “организатора”, возможно, что собственно нейроэктодерма также способна в определенной степени к генерации различий вдоль своей переднезадней оси. В процессе развития эти региональные тенденции “закрепляются” с помощью “организатора” и в дальнейшем более тонкая и детальная компартиментализация центральной нервной системы все больше и больше обособливается от внешних влияний. На продвинутых стадиях развития ведущая роль в процессах морфо-функционального подразделения нервной системы позвоночных отводится генам, гомологичным генам сегментации тела зародышей плодовой мушки *Drosophila*.

Нам не хотелось, чтобы у читателя сложилось впечатление, что проблема первичной регионализации нервной системы позвоночных уже решена. Напротив, мы находимся только в начале пути. Доступность нейрализующих и мезодермализующих молекулярных факторов позволяет планировать опыты по искусственному созданию соответствующих морфогенетических градиентов в пределах культивируемых

фрагментов нейроэпителлия. С другой стороны, наличие молекулярных маркеров позволяет оценивать морфогенетические эффекты очень быстро и на молекулярном уровне, не дожидаясь формирования в культурах тех или иных нейральных структур (как это приходилось делать в XX в.) Все это обещает прогресс в понимании молекулярно-генетических механизмов регионализации нервной системы, но только при условии притока новых конструктивных идей в эту область биологии развития. Попытаться пробудить интерес новой генерации биологов к классическим проблемам нейральной индукции и нейральной регионализации и составляло нашу задачу. Дополнительную “пищу” для теоретических размышлений и рабочих гипотез читатель сможет найти в рекомендуемой библиографии.

ЛИТЕРАТУРА

- Корочкин Л.И.* Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999. 250 с.
- Михайлов А.Т.* Эмбриональные индукторы. М.: Наука, 1988. 216 с.
- Михайлов А.Т.* Экспериментально-биологические, биохимические и молекулярно-биологические подходы к идентификации эмбриональных индукторов // Журн. общ. биологии. 1989. Т. 50, № 2. С. 149–157.
- Саксен Л., Тойвонен С.* Первичная эмбриональная индукция. М.: Изд-во иностр. лит., 1963. 343 с.
- Gilbert S.F., Saxen L.* Spemann's organiser: Models and molecules // Mechanisms Develop. 1993. Vol. 41. P. 73–89.
- Gurdon J.B., Harger P., Mitchell A., Lemaire P.* Activin signalling and response to a morphogen gradient // Nature. 1994. Vol. 371. P. 487–492.
- Kelly O.G., Melton D.A.* Induction and patterning of the vertebrate nervous system // Trends Genet. 1995. Vol. 11, N 7, P. 273–278.
- Le Douarin N.M., Teillet M.-A., Catalu M.* Neurulation in amniote vertebrates: A novel view deduced from the use of quail-chick chimeras // Intern. J. Develop. Biol. 1998. Vol. 42. P. 906–916.
- Saxen L.* Neural induction // Ibid. 1989. Vol. 33. P. 21–48.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НЕЙРОГЕНЕЗА

Все нейральные функции от простого сенсорного ответа и моторной команды и до сложного познавательного поведения – зависят от слаженной работы ансамблей нервных клеток, формирующихся в ходе индивидуального развития.

Процесс дифференцировки нейрона, прохождения клеткой многоступенчатого пути от незрелого нейробласта до специализированного нейрона, обслуживается иерархической системой генов, взаимодействующих друг с другом и функционирующих на разных уровнях (рис. 5.1).

1. **Гены, функционирующие в самом дифференцирующемся нейроне.** Например, *pcd* (*Purkinje cell degeneration*) и *Lurcher* нарушают развитие мозжечка у мышей. У животных, гомозиготных по этим генам, в определенный момент постнатального онтогенеза селективно погибают клетки Пуркинье со всеми вытекающими отсюда поведенческими последствиями. Анализ химерных животных

$$\frac{pcd}{pcd} \leftrightarrow \frac{+}{+} \quad \text{и} \quad \frac{Lc}{Lc} \leftrightarrow \frac{+}{+}$$

позволил заключить, что гены гибели клеток Пуркинье экспрессируются в самих этих клетках. Аномалии в их экспрессии вызывают характерную для мутантов клеточную дегенерацию.

Такие “внутриклеточные” генные комплексы, действующие в пределах самой клетки и непосред-

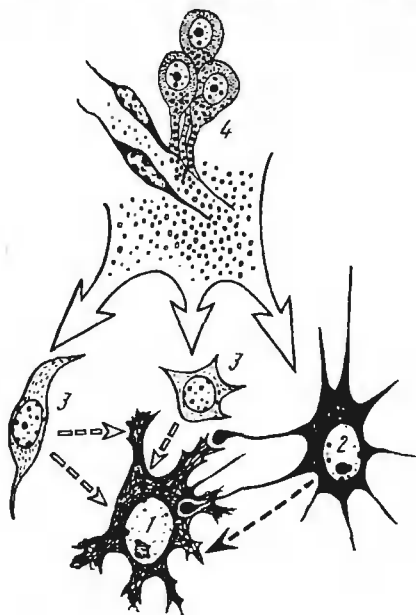


Рис. 5.1. Иерархия генетических систем, контролирующих процессы нейрогенеза. По Корочкину.

1 – генетические системы, действующие внутри самого дифференцирующегося в определенном направлении нейрона; 2, 3 – генетические системы, действующие внутри других нейронов и тканей и обнаруживающие свой эффект на его дифференцировку через влияние этих тканей и образующихся в них продуктов (включая нейроростовые факторы); 4 – генетические системы, действующие в эндокринных и нейроэндокринных органах и осуществляющие свой эффект на дифференцировку нейронов на организменном уровне через эффекты различных гормонов и вообще веществ, проявляющих свою активность на уровне целого организма.

ственно формирующие ее фенотипические признаки, можно подразделить по крайней мере на четыре генетические подсистемы, контролирующей различные этапы нейрогенеза.

а. Генетическая подсистема, контролирующая **позиционную информацию**, некий генетический механизм, общий для эпидермиса и нервной системы, который используется для реализации позиционной информации или регуляции клеточных взаимоотношений, формирующих позиционную информацию.

б. Генетическая подсистема, ответственная за **локальные взаимодействия** данной клетки с соседними. Это – гены, включенные в регуляцию латерального торможения нейробластами соседних клеток, производных эктодермы, дифференцирующихся вследствие этого торможения в не-нейральные производные. Если с помощью лазерного луча убить клетку, вступившую на путь нейральной дифференцировки и снять таким образом латеральное торможение, то одна из соседних клеток занимает ее место и вместо эпидермального пути развития выбирает нейральный (рис. 5.2). Известны нейрогенные локусы, ответственные за осуществление этого вида регуляции, ниже они будут рассмотрены.

в. Генетическая подсистема, ответственная за **детерминацию нейробластов и ганглиозных материнских клеток**. Для столь важных в нейрогенезе событий, каковым является детерминация, определение клеточной судьбы, существуют специальные гены, о которых пока что известно мало, но предполагается участие в этом процессе гомеодоменов и генных комплексов типа *Antennapedia (ANT-C)* и *bithorax (BX-C)*.

г. Генетическая подсистема, контролирующая **сегментарную спецификацию** нервных клеток. Межсегментные нейрональные различия проявляются в числе предшественников нервных клеток, количестве их делений, особенностях гибели клеток, составляющих их потомство, и в особенностях дифференцировки этого потомства. Поскольку известно, что у дрозофилы, например, качественная специфика сегментации эпидермиса контролируется гомеозисными генами *ANT-C* и *BX-C* комплексов, можно было предполагать функциональное участие этих комплексов в процессе регионализации нервной системы. Это предположение подтверждается экспериментами с использованием иммуногистохимической техники и методов гибридизации *in situ* на срезах фрагментов ДНК, содержащих *ANT-C* или *BX-C*.

В этих экспериментах было показано, что экспрессия гомеозисных генов сегментоспецифична в центральной нервной системе. Подобные данные были получены, как мы увидим, и при исследовании регионализации нервной системы позвоночных, так что участие гомеозисных генов в сегментарной специализации различных элементов нервной системы можно считать доказанным.

2. **Гены, функционирующие в других нейронах.** У тех же мутантов *Lurcher* наряду с клетками Пуркиньи погибают до 80% клеток-зерен мозжечка. Отчего они дегенерируют: вследствие плейотропного эффе-

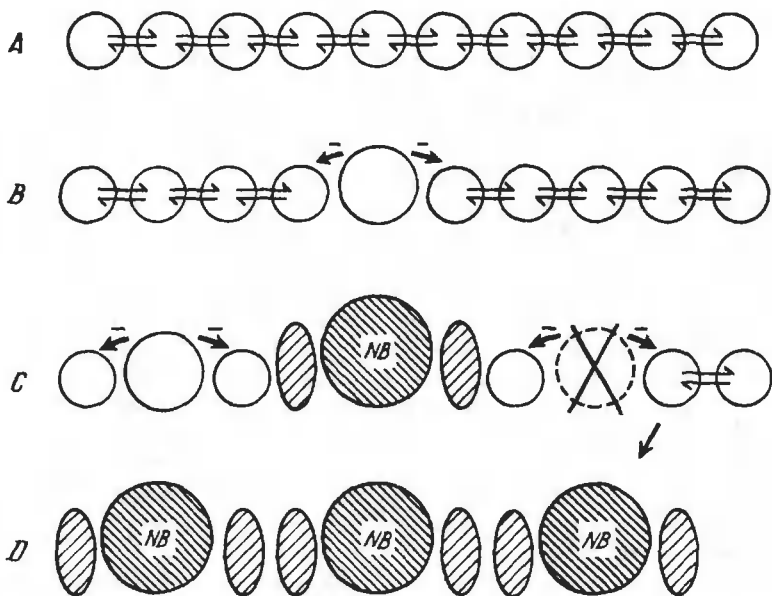


Рис. 5.2. Схема, иллюстрирующая феномен латерального торможения.

A – все клетки нейроэктодермы (пECs) эквивалентны и взаимодействуют друг с другом (стрелки). *B* – одна клетка начинает увеличиваться и превращается в нейробласт (NB) и тормозит соответствующий процесс в соседних клетках. *C* – средние клетки дифференцировались (NB, а также две соседние, заштрихованные опорные клетки), латеральные NBs начали укрупняться и тормозить соседние пECs (стрелки). Если увеличившийся в размере нейробласт (очерченный пунктиром кружок справа) удалить, соседние пECs освобождаются от латеральных тормозных влияний и начинают увеличиваться в размерах, замещая удаленный нейробласт. *D* – все клетки данного ассоциата дифференцировались.

По Gudman.

кта гена *Lurcher* или в силу некоторых других обстоятельств? Оказалось, что у мутантов *pcd* клетки Пуркинье дегенерируют не ранее чем через месяц после рождения и клетки-зерна успевают установить с ними контакты и в связи с этим пройти путь в своем развитии, достаточный, чтобы не погибнуть. У мутантов *Lurcher* клетки Пуркинье дегенерируют значительно раньше, поэтому клетки-зерна не успевают образовать систему отростков и синаптических связей, предохраняющих их от гибели. Их смерть запрограммирована, таким образом, в генах (апоптоз), нарушение экспрессии которых сказывается первично на судьбе совсем других нервных клеток, хотя с ними и связанных. Поражение клеток-зерен является в таком случае вторичным, реализующимся по иному механизму.

У мутантов-вертунов (*reeler*) первичным является действие мутировавшего гена в клетках-зернах, которые все теряют способность мигрировать и задерживаются в поверхностном слое, в результате чего нарушаются обычные отношения между слоями и, как следствие, наблюдается уменьшение числа параллельных волокон, а у клеток Пуркинье от-

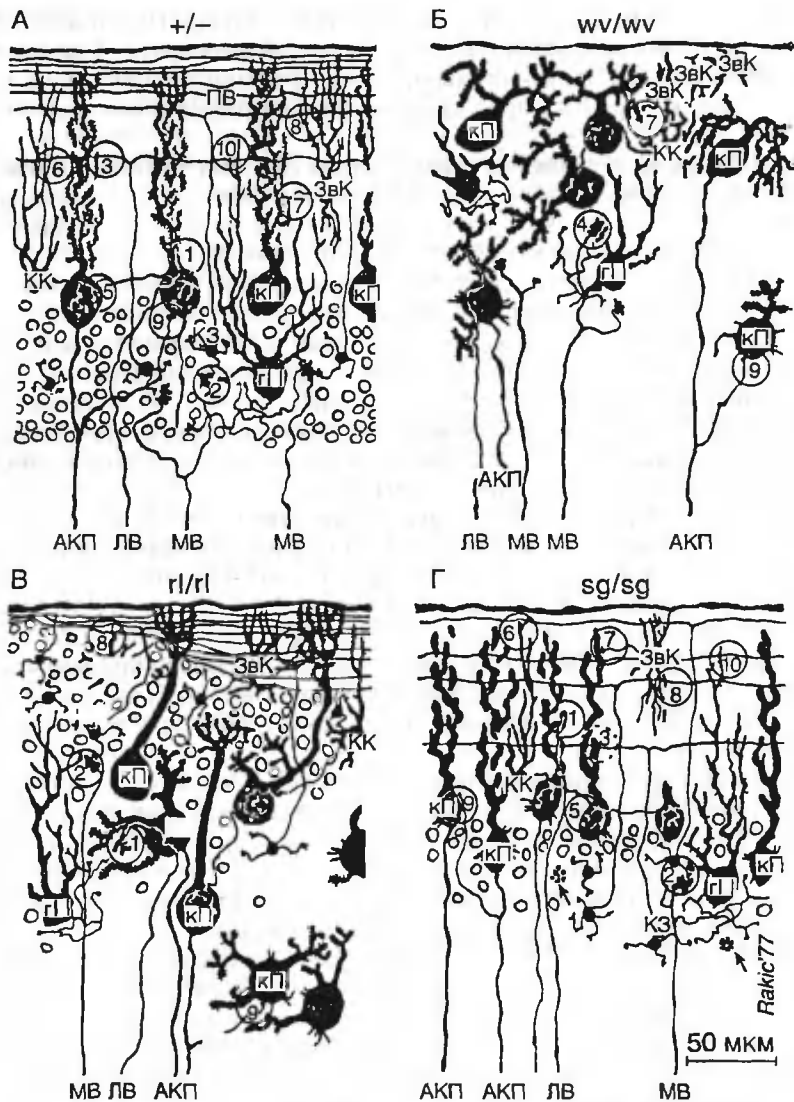


Рис. 5.3. Типы клеток в мозжке нормальной мыши (А) и в мозжке нескольких мутантных линий (Б-Г).

КК – корзничатая клетка, ЛВ – лиановидные волокна, КЗ – клетки-зерна, ПП – клетка Гольджи типа II, МВ – мшистые волокна, КП – клетки Пуркинье, АКП – аксоны клеток Пуркинье, ПВ – параллельное волокно. ЗвК – звездчатая клетка. Цифры в кружках означают соответствующие типы синапсов. По Caviness, Rakic, 1978.

отсутствует характерное ветвление. Изменения клеток Пуркиньи указывают на то, что созревание дендритных ветвей и дендритных выростов-шипики в своей заключительной стадии регулируется аксонами клеток-зерен, которые в норме представлены параллельными волокнами (рис. 5.3).

3. Гены, действующие в глиальных клетках. Вполне естественно зависимость развития нейральных клеточных ансамблей от степени дифференцированности глиальных клеток. В качестве примера можно привести нарушения в развитии мозга при синдроме Дауна.

Одним из факторов, обуславливающих недоразвитие нервной ткани у больных, является, по-видимому, нарушение глиогенеза, обусловленное тем, что при данном варианте трисомии возрастает доза гена, кодирующего S-100 белок и экспрессирующегося очень рано в ходе детерминации и дифференцировки глиальных клеток. Существенные нарушения в развитии нейронов могут быть вызваны мутациями, затрагивающими гены, контролирующие образование миелиновых и шванновских оболочек в проводящих нервных путях.

4. Гены, действующие в окружающих тканях. Это гены, определяющие особенности развития тканей-мишеней и окружающих тканей и косвенно влияющие на экспрессию нейрогенов. Например, у дрозофилы при мутации *Hairy wing* резко возрастает число волосков на крыле, что сопровождается, во-первых, увеличением количества соответствующих рецепторных нейронов и, во-вторых, нарушением фундаментального принципа, касающегося хода отростков сенсорных клеток. В норме они не выходят за пределы своего компартмента, у мутантов это правило нарушается.

Далее нервы крыла распространяются по ходу жилок, но у мутантов, у которых жилки отсутствуют, паттерн распространения нервных волокон сохраняется. Следовательно, в ткани крыла функционируют гены, которые детерминируют формирование такого пространственного распределения концентраций каких-то веществ, которое преформирует пути распространения отростков нервных клеток.

У мыши известны мутации, нарушающие становление системы эмбриональной индукции, – это мутации серии *T*, *Ki*, *Sd*. Одним из следствий проявления этих мутаций являются аномалии в нейроморфогенезе: у *Ki/Ki* эмбрионов – гиперплазия и дубликации (удвоения структур) в нейроэктодерме, у мутантов *T/T* – недоразвитие нейральной закладки. Первичным в этих случаях является поражение хордомезодермального материала, т.е. ткани индуктора. Аномалии в формировании нервной системы отражают в данном случае не первичные нарушения и функционировании собственного генетического аппарата нейробластов, а являются следствием нарушений в функционировании генетического аппарата окружающей ткани.

5. Гены, действующие на организменном уровне. К ним следует причислить гены, контролирующие гормональный статус организма. Известно, к каким существенным перестройкам в структуре нейронов и их ассоциатов ведет сдвиг соотношения экдизон/ювенильный гормон при метаморфозе насекомых. Заметные изменения претерпевает нерв-

ная ткань и при тиреотоксикозе и других гормональных расстройствах. Например, в кишке головастиков жабы-повитухи под влиянием инъекций тироксина может сформироваться мейсснеровское сплетение, в норме у них отсутствующее.

Мы построили, таким образом, если так можно выразиться, **вертикальный пространственный иерархический ряд генов**, расставляющих на разных уровнях “направляющие флажки” на пути становления нервной клетки.

Но гены слагаются еще и в **горизонтальный, временной ряд** в зависимости от того эффекта, который они оказывают на последовательный во времени переход от одной фазы клеточной детерминации и дифференцировки к другой.

В их числе и так называемые ранние гены, лучше всего изученные у дрозофилы. Вполне естественно, что они (гены) должны вести нервную клетку по предначертанному ей пути, начиная с того момента, когда она отделяет себя от окружающих тканей и однозначно выбирает свою судьбу.

Эти события происходят в уже поляризованной развивающейся системе, создаваемой генами поляризации, которых у дрозофилы известно около трех десятков. От них зависит формирование кранио-каудальной и дорзо-вентральной осей зародыша. Мутанты по некоторым из этих генов могут быть безголовыми, с двумя головными или каудальными полюсами или утрачивают брюшко и полярную плазму и т.д. Продукты этих генов, например, гена *bicoid*, образуют градиент распределения, наподобие градиента распределения индукторов позвоночных.

Функционируя в период созревания яйцеклетки, гены поляризации синтезируют некоторые продукты загодя, до того как они понадобятся зародышу. Подобный принцип опережения является особенностью индивидуального развития многоклеточных.

На такой предварительно поляризованной основе обнаруживает свою активность следующая, более поздняя группа генов, которая обуславливает регионализацию эктодермальной закладки на дорзальный и вентральный отделы. Из дорзальной эктодермы в последующем развиваются только эпидермальные производные, вентральный называют **вентральным нейрогенным регионом (vnR)**, из которого формируются как эпидермальные, так и нейральные производные (рис. 5.4).

Нейроспецифические гены контролируют межклеточные взаимоотношения, которые играют существенную роль для правильного разделения клеток внутри так называемой эквивалентной группы (equivalence groups) в ходе эмбриогенеза и при метаморфозе у дрозофилы.

“Эквивалентная группа” составляется из набора клеток, члены которого обладают потенциалом к принятию (adoption) той или иной клеточной судьбы.

В норме, хотя все клетки внутри такой группы имеют равные потенциалы, только одна или несколько клеток из каждой данной группы реализуют потенциал развития в направлении нейробластов, в то время как другие члены группы развиваются по альтернативному пути.

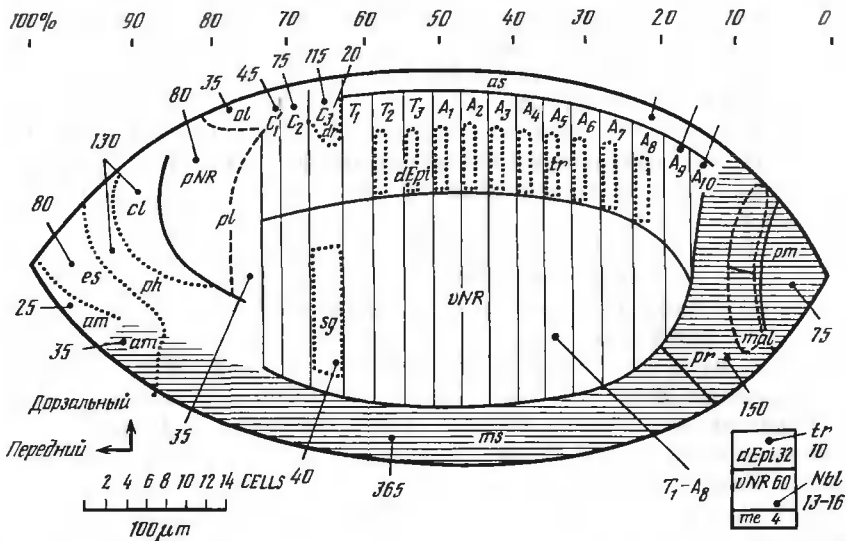


Рис. 5.4. Карта презумптивных закладок у дрозофилы на стадии бластодермы. Заштрихованные области будут инвагинировать в ходе гаструляции, числа показывают размеры различных закладок (количество клеток) на одной стороне зародыша бластодермы. Шкала показывает процент длины яйца. *vNR* – вентральная нейрогенная область. *pNR* – процефалическая нейрогенная область.

Каждый из T1-A8 сегментов состоит из 32 дорзальных эпидермальных (*d-epi-не-нейрогенных*) клеток, 60 вентральных эпидермальных клеток (*vNR* – нейрогенные), 13–16 из которых (в зависимости от сегмента) будут развиваться как нейробласты (*Nbl*) и 4 мезэктодермальных клеток (*me*).

C1-C3 – гнатальные сегменты, верхняя (максилла) и нижняя (мандибула) челюсти, губа (*labium*), *T1-T3* – торкальные сегменты, *A1-A10* – брюшные (абдоминальные) сегменты, *am* – передний кишечник. *as* – амниосероза, *cl* – clypeolabrum, *es* – пищевод, *mal* – Мальпигиевы сосуды, *ms* – мезодерма, *ph* – фаринкс, *pl* – процефалическая доля, *pm* – задний кишечник, *pr* – проктодеум. По Campos-Ortega.

Первый выбор, который осуществляет клетка эктодермальной закладки, – стать дорзальной или вентральной. Точно так же приходится выбирать и еще одну полярность – передне-заднюю.

Контролируемая соответствующими генами дорзализация и вентрализация клеточных закладок столь сильна, что на ее фоне не проявляются эффекты генов, которые определяют дальнейшую судьбу клеток, а именно их развитие в нейральном или эпидермальном направлении. Так, введение различных аллелей гена *Notch*, индуцирующих нейрализацию всего эпидермиса вентральной нейрогенной закладки, в особой с мутантным дорзальным фенотипом не приводит к ожидаемому эффекту: клетки, где содержится мутантный ген *dorsal* в гомозиготе, теряют способность к нейрализации даже в экспериментальных условиях, обычно способствующих такому эффекту. Напротив, введение гена *Notch* в геном, содержащий активный ген вегетализации *Toll*, ведет к нейрализации эпидермиса не только вен-

тральной, но и дорзальной половины зародыша, чего в обычных условиях не происходит.

Следовательно, оба упомянутых гена эпистатичны по отношению к генам, включенным в процесс коммитирования эктодермальных клеток. При этом установлено, что нейрогенные способности эктодермальных клеток скорее зависят от активности генов, контролирующих эмбриональный дорзо-вентральный паттерн, чем от положения клеток.

Таким образом, реализация генетической программы нейрогенеза на первом этапе эмбрионального развития подразделяет эмбриональную закладку на две части – вентральную, способную развиваться как в нейральном, так и в эпидермальном направлении, и дорзальную, в которой способность к нейрализации подавлена.

Нейрализация осуществляется на фоне активности совершенно определенной генетической системы, подготавливающей клетки к вступлению на нейральный или эпидермальный путь развития. В этих условиях перед 1800 клетками, составляющими вентральную нейрогенную закладку, встает вопрос, чем быть (чем стать): нейроном или эпидермальной клеткой. Каждая клетка стоит перед таким выбором и делает его. Как оказалось, выбор этот определяется специфической генетической системой, которая представлена двумя группами локусов, которые Кампос-Ортега предложил обозначить как нейрогенные и антинейрогенные.

Антинейрогенные локусы (сейчас их чаще называют **пронейрогенными**). Это такие локусы, мутации которых обуславливают недоразвитие нервной системы, проявляющиеся в разной степени и в разные периоды развития дрозофилы. **Они в основном собраны в кластер в районе 1В X-хромосомы.** К ним принадлежат следующие гены: *achaete-scute* (*AS-C-complex*), *Ec-4*, *elav*, *ventral nervous system condensation defective* (*vnd*) и ген *denerved*, локализованный в зоне 31АВ 2-й хромосомы. Кроме того, мутации еще более 20 генов вызывают аномалии в развитии периферической нервной системы, к таковым, в частности, относятся *cut*, *lozenge* и др. Возможно, такое совместное расположение антинейрогенных локусов является следствием более общего, кластерного принципа организации генома, выявленный в отношении ряда семейств генов у многих объектов.

Гены, расположенные в интервале 1В1-1В10 и обуславливающие в случае их мутаций морфологически регистрируемые нарушения в эмбриональной нервной системе, могут быть разделены на две группы: 1) *sc*, *elav*, *vnd*, мутации которых ведут к заметным дефектам в развитии центральной нервной системы, и 2) *ac*, *sc-alpha* и проксимальная зона вправо от *elav* и *vnd*, содержащая ряд генов, делеции которых обуславливают несомненный мутантный фенотип, тем не менее их роль в развитии нервной системы зависит также от эффектов других нейроспецифических генов (рис. 5.5).

Активация генов *achaete*, *scute*, *lethal of scute*, кодирующих *helix-loop-helix proteins*, предшествует вычленению пронеиральных клеток из *vNR*. Экспрессия гена *achaete* сохраняется в дальнейшем только в клет-

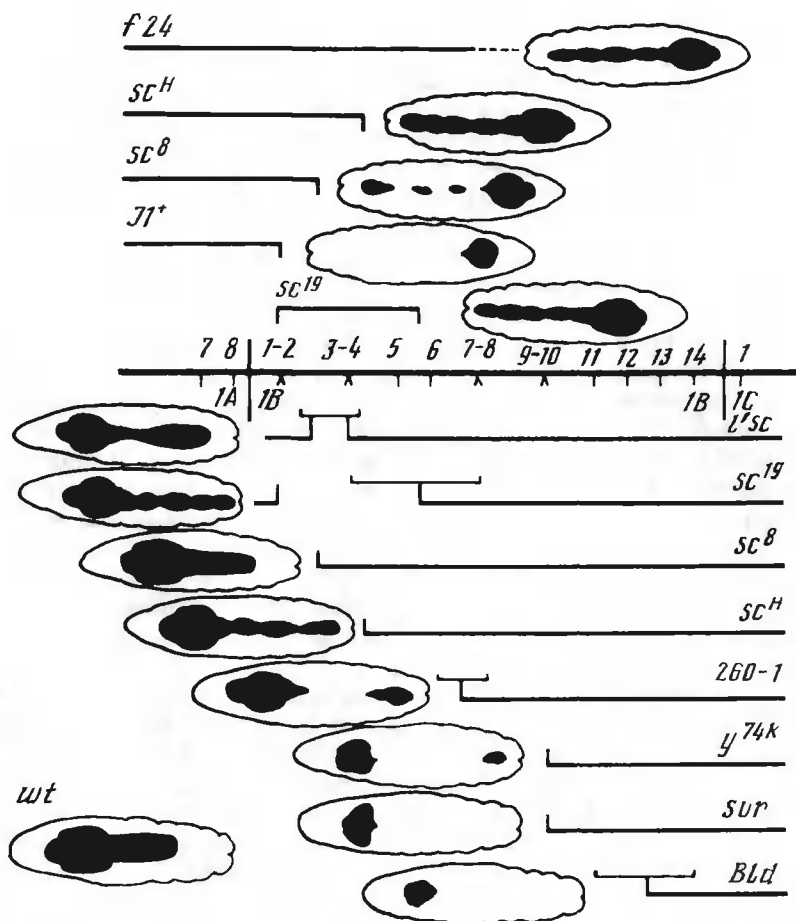


Рис. 5.5. Схематическое изображение эффекта делеций в области proneuroгенных (антинейрогенных) локусов на развитие личиночной нервной системы дрозофилы. По Campos-Ortega, Jimenez, 1980.

ках, становящихся нейробластами, в остальных клетках vNR она утрачивается.

У нейромутантных эмбрионов начальный паттерн экспрессии *achaete* сравним с таковым у эмбрионов дикого типа.

Каждая клетка поддерживает экспрессию *achaete*, что определяет судьбу нейробластов. Эти данные наводят на мысль, что экспрессия этого локуса как бы "обрисовывает" proneуральные "equivalence groups". И, следовательно, функция нейрогенов требуется и для того, чтобы "выбрать" паттерн экспрессии *achaete*, который отражает разделение судьбы нейробластов и дермобластов внутри эмбриональной proneуральной "equivalence group".

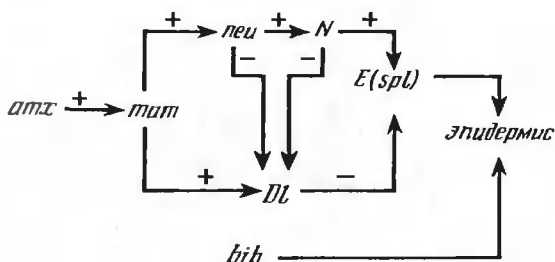


Рис. 5.6. Взаимодействия нейрогенных локусов. По Campos-Ortega.
 “+” – отношения эпистаза–гипостаза. Объяснение в тексте.

Снижение функции генов *AS-C* ведет к редукции количества клеток в эмбриональной нервной системе путем снижения количества эктодермальных клеток, которые коммитированы к развитию в нейробласты, и увеличения гибели клеток в развивающейся нервной системе.

Эффект антинейрогенных локусов сказывается на развитии как центральной, так и периферической нервной системы, и лишь делеции большого размера, вроде *Df(1)svr*, вызывают также некоторые аномалии не-нейральной природы.

Комплекс *achaete-scute (AS-C)*, как один из основных нейроспецифических локусов, довольно интенсивно исследован с помощью методов молекулярной генетики и геной инженерии. Этот комплекс был выделен и клонирован, размеры области *sc-75* кб. Для гена *as* обнаружен один транскрипт размером 1,1 кб (T5). Для локуса *scute* – транскрипты T4 (*scute alpha*), T3 (*l'scute*), T2 (*scute beta*), T1 и T1a (*scute gamma*).

Оказалось при этом, что транскрипты T3 и T1a существенны для развития центральной нервной системы, а транскрипты T4 и T5 – для развития периферической нервной системы. Транскрипт T3 отражает функцию гена *lethal of scute* в эмбриональном периоде, транскрипт T2 необходим для нормального развития макрохет.

Приобретение одной (или немногими) клеткой из *equivalence group* нейральной детерминации сопровождается подавлением потенциалов соседних клеток к развитию в нейральной направлении. Это подавление осуществляется в результате взаимодействия нейрогенных по Кампосу – Ортега генов.

Нейрогенные гены – это те гены, мутации которых вызывают гипернейрализацию в вентральной нейрогенной закладке, так что все составляющие ее клетки претерпевают нейральную трансформацию, теряя потенциал к развитию в альтернативном направлении. Известно несколько таких генов (рис. 5. 6, 5.7).

Родственен нейрогенным локусам и ген *Hairless (H)* – генетическая локализация 3–69,5, цитогенетическая – 92Д-94А), он может предотвратить клеточную летальность, обусловленную гомозиготностью по некоторым *Df*-аллелям. Предполагается, что мишенью гена *H* является

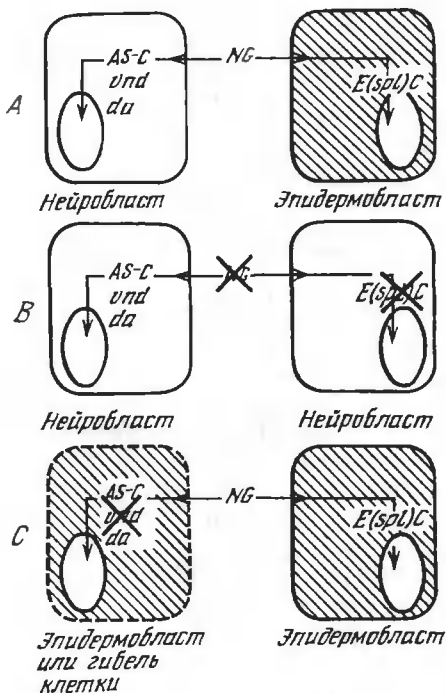


Рис. 5.7. Взаимодействия между нейробластами и эпидермобластами.

А – две взаимодействующих клетки нейроэктодермы дикого типа. Большое количество нейрогенных генов (*NG*), включая гены комплекса enhancer of *split* (*E(spl)C*), гены achaete-scute комплекса (*AS-C*), гены дефектов конденсации ventральной нервной системы (*vnd*) и ген *daughterless* (*da*), кодирующие белки цепей регуляторных сигналов, разрешают клеткам развиваться в нейробласты или в эпидермобласты. Функции, кодируемые генами *AS-C*, *vnd*, *daughterless*, требуются для того, чтобы регулировать активность генов в нейробластах. Функциональные цепи, кодируемые генами *E(spl)C* комплекса, необходимы для регуляции генов в эпидермобластах.

В – мутация одного из нейрогенных генов вызывает развитие всех нейроэктодермальных клеток как нейробластов. С – мутации генов *AS-C*, *vnd*, *daughterless* вызывают или развитие презумптивных нервных клеток как эпидермобластов или клеточную гибель. По Campos-Ortega.

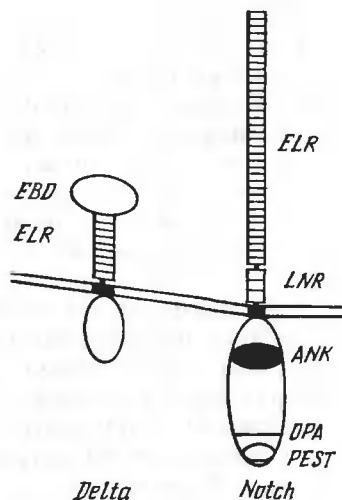
локус *E(spl)*. Эффект гена *H* на *E(spl)* и последнего на *N* и *Dl* подтверждается тем, что мухи с тремя нормальными копиями гена *H* и двумя *E(spl)* обнаруживают ненормальности крыла, весьма сходные с фенотипом крыла мух, содержащих только одну копию *E(spl)*. Эти ненормальности отсутствуют, когда мухи несут дополнительную дупликацию нормального локуса *E(spl)*. Таким образом, нормальный аллель *H* ведет себя как функциональный репрессор нейрогенных локусов *N*, *Dl* и *E(spl)*. При этом нейрогенные локусы организованы иерархически по отношению к влияниям локуса *H* и по отношению друг к другу (рис. 5.6).

Три нейрогенных гена *N*, *Dl* и *bib* кодируют продукты, ассоциированные с клеточной мембраной. *Notch* и *Delta* кодируют белки клеточной мембраны, которые проявляют сложный и динамический паттерн экспрессии в ходе развития.

Продукт гена *Notch* (рис. 5.8), синтезируемый транскриптом в 10,5 кб-трансмембранный белок, состоящий из 2703 аминокислот, непротесурируемый и содержащий сигнальный пептид, 36 tandemных повторов родственного эпидермальному фактору роста (EGF) 40 аминокислотного мотива, 3 tandemных повтора, обнаруженных в экстраклеточном домене, последовательность идентичную кодируемой геном *lin 12* *Caenorhabditis elegans*, единственный включенный в мембрану домен и внутриклеточный домен, который включает 6 tandemных повторов мотива, найденного в анкирине (ANK repeat) позвоночных и дрожжевых *cdc10* и *SW16* генов, ора-последовательность с преобладанием трипле-

Рис. 5.8. Схема структуры белков, кодируемых генами *Notch* и *Delta*.

Клеточная мембрана представлена двумя параллельными мембранами. Выше мембраны представлен экстраклеточный компонент белка, ниже – внутриклеточный компонент белка. *ELR* – EGF-подобный повторяющийся мотив, *LNR* – *lin12/Notch* – повторяющийся мотив, *ANK* – анкирин-повторяющийся мотив, *OPA* – полиглутаминовый район, *PEST* – область, богатая пролиновыми, глутаматными, сериновыми и треониновыми остатками. По Muskavitch.



тов CAG и CAA, кодирующих аминокислоту глутамин, не только транскрибируемая, но и транслируемая, найденная также в некоторых гомеозисных генах, например, *Antennapedia*, где она обозначена как M-повтор, и PEST region, богатый пролином, глутамином, серином и треонином. ANK повтор является доменом, вовлеченным в межмолекулярные взаимодействия. Функциональная роль M-повторов, сводится к тому, что они обеспечивают стабильность белковой молекулы или соединяют функционально значимые домены в одно целое. Возможно, что *Notch* внутриклеточный домен взаимодействует с одним или более цитоплазматическими белками в процессе передачи сигнала. Структура *Notch*, следовательно, соответствует предполагаемой его роли как трансмембранного рецептора, который взаимодействует с лигандами в экстраклеточном компартменте.

Delta белок состоит из 833 аминокислот, содержит сигнальный пептид (см. рис. 5.8), аминокислотный терминальный домен, гомологичный аминокислотному домену белка, кодируемого геном *Serrate* дрозофилы, 9 тандемных повторов мотива, родственного эпидермальному фактору роста (i.e., EGF-подобные повторы или “ELRs”), один включенный в мембрану домен и внутриклеточный домен без существенной гомологии с какими-либо известными белками.

Нейрогенный ген *bib* кодирует мембран ассоциированный белок, включающий 6 включенных в мембрану доменов и гомологичный множеству канал-формирующих белков.

Три других нейрогенных гена – *neu*, *tat* и *E(spl)* – кодируют белки, которые функционируют в клеточном ядре. Ген *tat* кодирует большой ядерный белок с чередующимися кислыми и основными доменами, которые могут отражать их функцию как ДНК или хроматин-связывающих белков.

Ген *neu* кодирует ядерный белок с мотивом, напоминающим ДНК-связывающие белки и *zink-finger* мотив.

Локус *E(spl)* структурно сложен, занимает область 36 кб, вероятно, состоит из нескольких тесно сцепленных генов, содержит участки гомологии с комплексом AS-C и *c-myc*-онкогеном и включает минимум 11

транскрипционных единиц, которые кодируют по крайней мере два типа качественно различных белков.

Транскрипционные единицы m5, m7, m8 кодируют белки, являющиеся членами семейства HLH транскрипционных регуляторных факторов. Транскрипционная единица m9/10 кодирует ядерный белок с множественными копиями повторяющегося мотива (WD-40 repeat), найденного также в бета-единице трансдукцина позвоночных и в дрожжевом СДС4 белке. Ядерная локализация этих белков свидетельствует об их функции в качестве "downstream effectors" в сигнальных путях нейрогенных генов и об их значении в регуляции экспрессии генов, играющих роль в спецификации клеточной судьбы.

В ходе эмбриогенеза особенно заметно накопление транскриптов m4, m5, m7, m8. Первоначально их можно обнаружить во всех клетках вентральной нейрогенной закладки, затем лишь в клетках, избравших эпидермальный путь развития.

С нейрогенными локусами взаимодействуют также гены *deltex* и *Suppressor Hairless*, которые, как будет рассмотрено ниже, участвуют в передаче информации между клеточной поверхностью и ядром.

Следовательно, функциональное значение нейрогенных локусов заключается, 1) в обеспечении нейральной детерминации клеток, 2) в обеспечении клеток, развивающихся в эпидермальном направлении, белком, содержащим EGF-подобные домены, 3) в обеспечении их рецептором EGF. При этом синтез будущими нейробластами EGF-подобного белка создает вокруг них как бы антинейрогенное поле, в результате чего способность окружающих будущей нейрон соседей к дифференцировке в нейральном направлении подавляется. Если лазером убить такую клетку и снять таким способом образованное ею антинейрогенное поле, то ближайший сосед тотчас заполнит пробел и претерпит нейральную дифференцировку вместо предназначавшейся ему эпидермальную судьбу. Такого рода торможение способности клеток вентральной нейроэктодермальной закладки к развитию в нейральном направлении в результате воздействия клетки, начавшей нейральную дифференцировку, называется латеральным торможением (см. рис. 5.2).

Механизм нейрогенеза, вероятно, является универсальным, о чем свидетельствует обнаружение генов, гомологичных нейрогенным локусам дрозофилы у ряда других объектов, как позвоночных (*Xenopus*), так и беспозвоночных (*Caenorhabditis elegans*). У *Xenopus* был выявлен ген *X-Noth-1*, экспрессирующийся в нервной пластинке и ген *X-Delta-1*, также экспрессирующийся в нервной системе ранних эмбрионов, в клетках, являющихся перспективными первичными нейронами. Первичные нейроны у позвоночных появляются вначале в задней части нервной пластинки. Их появление сопровождается экспрессией нейроспецифического гена typeII beta-tubulin (N-tubulin), маркирующей самую раннюю стадию нейральной дифференцировки. С помощью гибридизации *in situ* на целых эмбрионах экспрессия *X-Delta-1* в нервной системе впервые была зарегистрирована в конце гастрюляции, в клетках, расположенных в специфических отделах нервной пластинки. Экспрессия *X-Delta-1*

предшествует экспрессии N-тубулина по крайней мере на 2 часа. Более того, *X-Delta-1* выключается в тот момент, когда начинает функционировать ген бета-тубулина. Сходным образом ген *X-Delta-1* последовательно экспрессируется в областях вторичного нейрогенеза, но не в зрелых нейронах. Иными словами, этот ген экспрессируется в проспективных нейронах ко времени их коммитирования к развитию в нейральном направлении.

У *Caenorhabditis elegans* также были найдены гомологичные нейрогенным генам локусы ДНК. Это – *lin12* и *gpl1*, являющиеся гомологами *Notch*, а также *lag2* и *apx1* – гомологи *Delta*.

Гомологи *Notch* обнаружены также у рыб, грызунов и человека.

Таким образом, начальные стадии в процессе нейрогенеза являются универсальными и заключаются в генерации пронеиральной области, небольшого кластера клеток, потенциальных предшественников нейронов. Этот процесс включает индукцию экспрессии пронеиральных генов, кодирующих факторы транскрипции класса helix-loop-helix (bHLH), наиболее заметным из которых является комплекс AS-C. Внутри каждой пронеиральной области, однако, не все клетки трансформируются в нейроны, и процесс их дифференцировки сопровождается сигналом латерального торможения, опосредованным нейрогенными генами, особенно важную роль среди которых играют гены *Delta* и *Notch*. Экспрессия *Delta* контролируется пронеиральными генами. Белок *Delta*, трансмембранный лиганд, активирующий ген *Notch*, инициирует внутриклеточные сигналы, которые ведут к репрессии пронеиральных генов и как следствие этого к регуляции *Delta*. Таким образом, эктодермальные клетки являются предметом локальных взаимодействий, что умножает первоначально минорные различия в уровне *Notch* сигналов. Клетки, в которых эти сигналы относительно слабые, становятся нейронами, в то время как клетки, в которых они достаточно сильны, претерпевают альтернативные изменения. Механизмы, с помощью которых контролируется нейрогенез у позвоночных и других животных, достаточно консервативны и сравнимы с теми, что обнаружены у дрозофилы.

И действительно, белки bHLH экспрессируются в нервной ткани позвоночных, и многие из них сходны по структурным признакам с пронеиральными белками дрозофилы.

Если инъецировать смесь транскрипта *X-Delta-1* гена *Xenopus* и транскрипта *lacZ* (служащего в качестве маркера распределения инъецированного транскрипта нейрогенного гена) в один из бластомеров двухклеточного эмбриона *Xenopus* (не-инъецированный бластомер служил в качестве контроля), и проанализировать развитие нервной системы, то оказывается, что наблюдается резкое снижение или полная элиминация клеток, экспрессирующих N-тубулин (маркер дифференцировки нервных клеток) на стороне инъекции, в то время как инъекция одного транскрипта *lacZ* не давала эффекта. Районы элиминации нервных клеток совпадали с зонами распределения инъецированных транскриптов, о чем свидетельствовала положительная гистохимическая реакция на продукт гена *lacZ*. Утрата экспрессии N-тубулина отражает элимина-

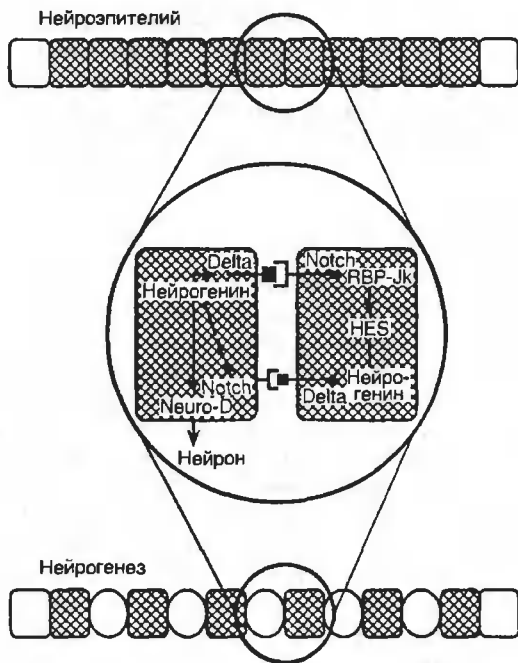


Рис. 5.9. Роль нейрогенина, нейро-D и Notch сигналов в определении нейрональной судьбы клеток.

Приобретение свойств, необходимых для развития в нервную клетку, требует действия bHLH и Notch белков. Схема демонстрирует, что экспрессия нейрогенина в левой клетке индуцирует экспрессию *Delta*, которая в свою очередь активирует Notch сигнал в правой клетке, что приводит в ней к репрессии экспрессии нейрогенина и к снижению экспрессии *Delta*. По аналогии со сходными сигналами у дрозофилы у позвоночных подобные функции осуществляются посредством белка RBR-Jκ, аналога дрозофилиного Suppressor Hairless [Su(H)] и белка HES (bHLH белка позвоночных, класса Hairy/enhancer of split [E(spl)]). Экспрессия нейрогенина индуцирует NeuroD, который способствует дифференцировке в нейрональном направлении, в то время как блокада этой экспрессии обеспечивает латеральное торможение. По Tanabe, Jessel, 1996.

цию нервных клеток на подопытной стороне развивающихся эмбрионов. В опытах с инъекцией транскрипта гена *X-Delta-ISTH*, утратившего внутриклеточный домен, был обнаружен противоположный только что описанному эффект – количество нервных клеток на инъекционной стороне существенно возрастает, о чем свидетельствует увеличение N-тубулин-положительных клеток. Совместные инъекции транскриптов *X-Delta* дикого и мутантного типа предотвращают гиперпродукцию нейронов и ведут вместо этого к супрессии нейрогенеза, как было найдено в экспериментах с введением одной РНК *X-Delta-1*. На основании анализа сравнительных данных была предложена модель молекулярных основ генетической детерминации судьбы клеток в ходе нейрогенеза у позвоночных (рис. 5.9). Из этой модели следует, что сверхэкспрес-

сия гена *Delta* или активированной формы *Notch* тормозит генерацию нервных клеток. Напротив, экспрессия доминантной негативной формы *Delta* вызывает генерацию дополнительных первичных нейронов. Очевидно, существует программа нейрогенеза, в рамках которой на ранних стадиях индивидуального развития определяется область нервной пластинки, внутри которой клетки способны генерировать нейроны. Реализация этой программы у позвоночных, как и у насекомых, связана с функционированием bHLH белков. Появление одного из таких белков позвоночных – **нейрогенина**, предваряет экспрессию гена *Delta* в тех областях нервной пластинки, которые предрасположены к генерации первичных нейронов.

Сверхэкспрессия нейрогенина ведет к расширению области, где экспрессируется ген *Delta*, и соответственно к увеличению количества клеток, развивающихся по нейральному пути. При этом нейрогенез не ограничивается более тремя полосками, но и в не-нейральной эктодерме появляются эктопические нейроны.

Сверхэкспрессия нейрогенина индуцирует также появление второго, более позднего bHLH белка – так называемого нейро-D, который тоже способен вызывать дифференцировку эктопических нейронов в не-нейральной эктодерме. Очевидно, нейрогенин у позвоночных является ранним стимулятором нейрогенеза и обуславливает последовательную активацию различных bHLH факторов, которые детерминируют развитие клеток в нейральном направлении или способствуют более поздним аспектам дифференцировки нервных клеток.

Взаимодействие *Delta* и *Notch* в процессе нейрогенеза изучено в основном у дрозофилы. Показано, что экстрацеллюлярный домен *Delta* способен взаимодействовать с белком *Notch* на поверхности противостоящей клетки.

При этом *Notch* функционирует как рецептор, который взаимодействует с лигандом в экстраклеточном компартмента и трансдуцирует полученную информацию внутрь клетки. В частности, это было продемонстрировано с помощью клонального анализа развивающегося эпидермиса эмбриональной *vrR*, *potum* и крыльев взрослой мухи у соматических мозаиков.

Notch в этом случае функционирует в клетках автономно, что было предсказано на основе представления, что белок *Notch* является рецепторной молекулой.

В то же время подобный анализ развития эпидермальных клеток в крыльях соматических мозаиков дрозофилы, содержащих клетки с мутацией *Delta*, показал, что функция *Delta* не автономна, так что если *Delta* экспрессируется в одной клеточной популяции, то эффект этого гена может распространиться на соседние клетки. Это свидетельствует о том, что его продукт может быть межклеточной сигнальной молекулой.

В культурах *in vitro* клеток дрозофилы с помощью иммуногистохимической реакции было показано, что продукты генов *Notch* и *Delta* могут взаимодействовать на клеточной поверхности в результате агрегации *Delta*-экспрессирующих клеток с *Notch*-экспрессирующими клетка-

ми. Это свидетельствует о важности родственного *Delta-Notch* связывания на клеточной поверхности. Оказалось, что ELRs 11 или 12 экстрацеллюлярных доменов необходимы и достаточны для связывания Delta с Notch. Следовательно, ELR мотивы белка Notch играют прямую роль в межклеточных взаимодействиях, при этом *Delta* amino-конец включен в домен, связывающий EGF-мотив. Значение *Notch ELR 12* во взаимодействиях *Delta-Notch* подтверждается и тем, что антиморфный *Notch* аллель (N M1) характеризуется наличием миссенс мутации в этом порторе.

Кроме того, белки, кодируемые генами *lag-2* и *apx-1* *C. elegans*, взаимодействуют с аналогом *Notch*, кодируемым у *C. elegans* геном *glp-1*, и содержат аминокислотную последовательность, гомологичную *Delta EBD* внутри amino-терминального конца соответствующего экстрацеллюлярного домена.

В процессе взаимодействия *Delta* и *Notch* вовлечены и другие гены, как например *deltex* и *Suppressor Hairless (SuH)*. Так, редукция в функции *deltex* ведет к расширению жилок (veins) крыла – эффекту, сходному с наблюдаемым при снижении функции *Delta*.

Белок SuH функционирует как “downstream” эффектор в опосредованной *Delta-Notch* сигнализации в ходе развития. При совместном культивировании клеток дрозофилы, в которых экспрессируются белки Notch и SuH и клеток, в которых экспрессируется *Delta*, SuH белок обнаруживается преимущественно внутри ядер клеток, экспрессирующих *Notch*. Следовательно, взаимодействия *Delta-Notch* на клеточной поверхности могут обуславливать ядерную локализацию белка SuH, способного к прямому связыванию с ДНК. SuH белок, взаимодействуя с комплексом *Delta-Notch*, транспортируется в ядро, что является молекулярным механизмом, обеспечивающим нейрогенным генам сигнальный путь между клеточной мембраной и ядром.

Общая модель взаимодействия генов *Notch*, *Delta*, *deltex*, *Suppressor Hairless* представлена на рис. 5.10, А.

Как следует из рисунка, это взаимодействие осуществляется через ряд стадий.

1. Образуется активная димерная форма белка Delta в сигнал-генерирующих клетках.

2. Димерный белок Delta координирует формирование димеров белка Notch в воспринимающих сигнал клетках. При этом мономеры Notch физически ассоциированы с белком *deltex*, который соединяется с внутренним доменом ANK повтора.

3. Опосредованная белком Delta димеризация Notch ведет к активации рецептора и высвобождению Notch-связанного *deltex* и способствует ANK повтор-зависимому связыванию SuH с интерцеллюлярным доменом *Notch* в сигнал-воспринимающей клетке.

4. Взаимодействие SuH с активированным Notch ведет к активации белка SuH, что стимулирует его ядерную транслокацию.

5. Активированный ядерный SuH действует на экспрессию генов, обеспечивающих спецификацию клетки.

Из рисунка следует, что мутации родственных *Notch* генов могут

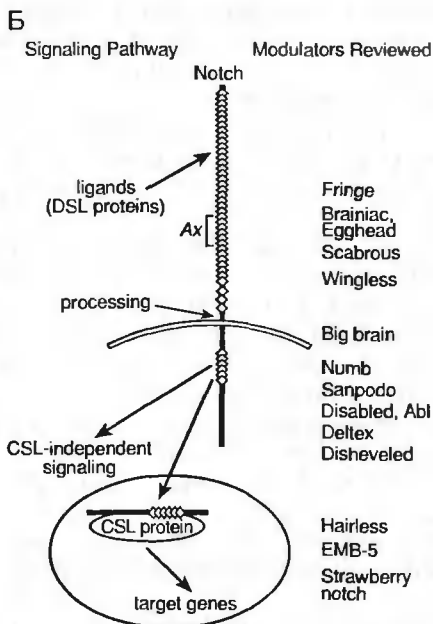
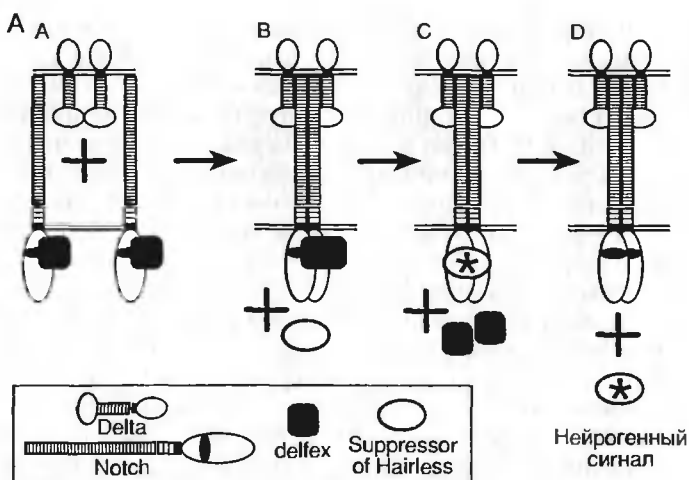


Рис. 5.10. Роль гена Notch в развитии нервной системы.

A – модель *Delta-Notch* опосредованного сигнала (*A* – активированный *Delta*-димер в мембране сигнализирующей клетки. *Notch*-мономеры, ассоциированные с *Deltex*, “ожидают” получения сигнала; *B* – *Delta*-димеры, ассоциируясь с мономерами *Notch*, активируют их димеризацию; *C* – связанные с мономерами *Notch* белки *deltex* высвобождаются и их место занимает белок *SuH*, связывающийся с активированным *Notch*. Последний катализирует его активацию; *D* – происходит диссоциация активированного *Su(H)* и *Notch*, в результате чего белок *Su(H)* транслоцируется в ядро, где стимулирует процессы транскрипции.) По Muskavitch, 1994. *B* – гены-модификаторы эффекта *Notch*. По Panin, Irvin, 1998.

привести к расстройствам высшей нервной деятельности типа старческой деменции и, возможно, болезни Альцгеймера у человека.

Нейрогенные гены в процессе развития клеток испытывают также влияние других генов. Сотрудник лаборатории нейрогенетики Института биологии гена В.В. Панин вместе с американским генетиком Ирвином обнаружили экстрацеллюлярный модулятор сигнальной системы *Notch-Delta*. Согласно их данным имеется несколько генов, кодирующих такие модуляторы – экстрацеллюлярные, трансмембранные цитоплазматические и ядерные (рис. 5.10, Б). Первым среди экстрацеллюлярных модуляторов был открыт ген *fringe*, который влияет на способность гена *Notch* быть активированным продуктами генов *Serratum* и *Delta*. Гомологи этого гена найдены у позвоночных, но не у *C. elegans*. Он кодирует секретлируемый гликопротеин, найденный как в диффузной, так и в мембран-связанной форме. Мутации других генов-модуляторов *brainiac* и *egghead* ведут к формированию фенотипа, сходного с вызванным утратой функции гена *Notch*. Последовательность аминокислот, кодируемая геном *brainiac*, принадлежит к семейству гликозилтрансфераз. Соответствующий продукт появляется уже в период оогенеза и требуется для интеграции не только нейральных структур, но и фолликулярных клеток. Еще один секретируемый димерный гликопротеин, содержащий родственный фибриногену домен, кодируется геном *scabrous* и необходим для развития периферической нервной системы. У мутантов по этому гену формируются дополнительные щетинки и, следовательно, дополнительные рецепторные аппараты, а также развиваются грубые глаза.

Из трансмембранных модуляторов следует отметить белки, кодируемые геном *big brain*, мутации которого вызывают нарушение латерального ингибирования. К цитоплазматическим модуляторам принадлежат продукты генов *numb*, *sapropodo*, контролирующих развитие центральной и периферической нервной системы, гена *deltex*, о функции которого уже говорилось, а также *able* и *disabled*, играющих важную роль в детерминации направления движения аксона. К ядерным модуляторам относят продукт гена *Hairless*. Он кодирует антагонистичный белку *Notch* продукт – белок EMB-5, идентифицированный у *C. elegans* и связывающий родственные *Notch* белки LIN-12 и GLP-1. Гомологичные белки найдены и у позвоночных. Недавно обнаружен также ген *Strawberry notch* (*Sno*), детерминирующий фенотип, родственный *Notch* мутантам.

У дрозофилы в определенных нервных клетках контроль нейрогенеза, опосредованный геном *Notch*, подвергается дополнительной регуляции посредством белков, которые асимметрично распределяются во время деления клеток-предшественников. Среди них заметен белок *Numb*, от которого зависит нейрональная “судьба” клеток, наследующих этот белок, ингибирующий внутриклеточную трансдукцию *Notch*-опосредованного сигнала. Родственные *Numb* белки были выявлены и у позвоночных, в частности, в вентрикулярной зоне коры головного мозга млекопитающих. Асимметрия в их распределении во время деления клеток-предшественников, видимо, играет важную роль в определении

клеточной судьбы, в формировании клеточного разнообразия в популяции нейробластов.

Kuzbanian (kuz) – еще один ген, имеющий существенное значение для разделения нейральных и не-нейральных клеток. Этот ген требуется клеткам для получения сигналов, тормозящих их нейральную детерминацию. У мутантов *kuz* обнаруживаются кластеры сенсорных щетинок в тех местах, где в норме присутствует только одна щетинка. Чтобы определить роль этого гена в развитии центральной нервной системы, получали эмбрионы, в которых отсутствовали его продукты и содержалась одна или ни одной зиготической копии соответствующей ДНК. У материнских *null* эмбрионов с одной копией зиготического гена *kuz* обнаружена гиперплазия и дезорганизация центральной нервной системы в вентральной части эмбриона, так что фенотипически эти эмбрионы напоминали мутантов *Notch*. Однако эмбрионы, у которых полностью отсутствовали как материнские, так и зиготические продукты гена *kuz*, имели более выраженный нейрогенный фенотип, так что гипертрофия нервной системы не ограничивалась вентральной областью, но значительно большее количество клеток эмбриона развивалось по нейральному пути.

Изучение развития сенсорных органов, где также обнаружен каскад генов, управляющих последовательными этапами становления специализированных чувствительных клеток, показало, что в этом случае ген *kuz* играет роль в процессе латерального торможения. Эта роль подтверждается тем, что все сенсорные щетинки в мутантном кластере клеток у соматических мозаиков были *kuz*-фенотипа, щетинки дикого типа в таком кластере присутствовали. Следовательно, функция *kuz* требуется клеткам для того, чтобы избежать судьбы нейрального предшественника.

Клетки в пронеуральном кластере с функцией *kuz* дикого типа получают тормозной сигнал и становятся эпидермальными, в то время как *kuz*-клетки не могут воспринять такой сигнал и развиваются как нейральные предшественники.

Ген *kuz* был клонирован. Он кодирует membrane-spanning protein длиной 1239 аминокислот, принадлежащий к семейству metalloprotease-disintegrin, известное как ADAM семейство (члены этого семейства содержат дезинтегриновый и металлопротеазный домены).

Некоторые члены семейства ADAM являются цинк-связывающими энзимами, и *kuz* металлопротеазный домен также содержит консервативный цинк-связывающий сайт. Дезинтегрины имеют цистеиновые остатки, которые требуются для их прямого связывания с рецепторами интегрина. Эти остатки обнаружены и в *kuz* белке. В этом семействе многие белки с мультидоменной структурой протеолитически процессируются и продуцируют множественные пептиды с различными функциями. Так же и молекула *kuz* как предшественник может быть расцеплена на металлопротеазный и дезинтегриновый домены, и эти продукты протеолиза выполняют различные функции.

У млекопитающих известен гомолог *kuz*, а именно bovine metalloprotease (BMP). Эти два белка обладают высокой степенью сходства

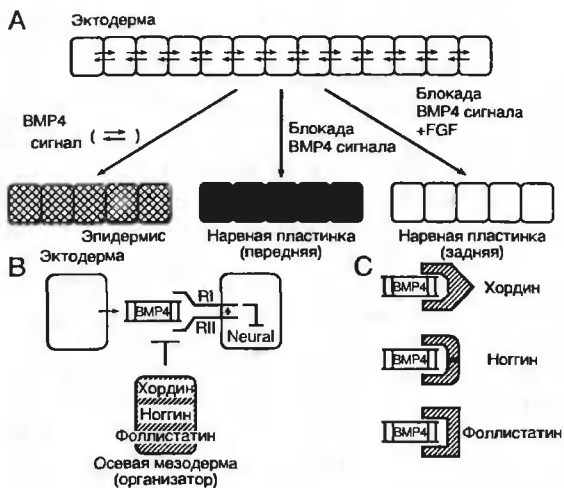


Рис. 5.11. Механизмы нейральной индукции у эмбрионов *Xenopus*.

А – эктодермальные клетки анимального полюса гастрულიрующего эмбриона являются мишенью для стимулирующего сигнала, опосредованного BMP4 (стрелки), который способствует их дифференцировке в эпидермальном направлении. Блокада BMP4 сигнала вызывает формирование ткани передней нейральной пластинки. Выдерживание эктодермы с FGF при условии блокады BMP4 ведет к образованию ткани задней нейральной пластинки. В – возможный механизм действия передних нейральных индукторов, производимых проспективной осевой мезодермы (область организатора). Хордин, ноггин и фоллистатин секретируются клетками организатора и индуцируют развитие нервной ткани путем блокады BMP4 – опосредованных сигналов между эктодермальными клетками. RI и RII – BMP рецепторные субъединицы. С – ноггин и хордин связываются с BMP4. Фоллистатин связывается с BMP7 и другими BMP. По Tanabe, Jessel, 1996.

(49% идентичности по аминокислотам), в том числе и в структурной организации. BMP был очищен из миелина мозга быка. Он способен переваривать основной белок миелина в условиях *in vitro* и, подобно кuz белку дрозофилы, включен в процесс нейрогенеза. В лаборатории М. Ниренберга (M. Nirenberg) был обнаружен еще один ген – NK-2, также, по-видимому, включенный в цепочку нейрогенеза.

Взаимодействие эпидермальной и нейральной закладок в ходе развития характерно также и для процесса нейрогенеза млекопитающих и, вероятно, позвоночных вообще. Эпидермальные сигналы осуществляются в этом случае членами семейства TGF (transforming growth factor) – белками BMP (bone morphogenic protein), играющими роль медиаторов эпидермальной эктодермы (рис. 5.11). У эмбрионов птиц в эпидермальной эктодерме на стадии ранней нервной пластинки экспрессируются белки BMP4 и BMP7, которые имитируют индуцирующий эффект. BMP белки активируют гены *Pax* и *Msx*, которые репрессируются продуктом гена *Shh*. Эти гены, однако, экспрессируются в клетках нервной пластинки, которые не генерируют клеток нервного гребня или дорзальные интернейроны, так что экспрессии генов *Pax* и *Msx* недостаточна для “разрешения” дифференцировки клеток дорзального типа.

Тем не менее у мыши экспрессия генов *Pax3* и *Pax7* требуется для дифференцировки клеток нервного гребня, из чего следует, что они частично вовлечены в процесс дифференцировки клеток дорзального региона.

Роль BMP в развитии дорзальных клеток сводится к индукции zinc finger транскрипционного фактора *Slug* в премигрирующих клетках нервного гребня. (Ген *Slug* содержит пять цинковых пальцев в 3'-половине белка. Область пальца имеет 89% аминокислотной идентичности с родственным гомологом *Xenopus-Xsna*).

После замыкания (closure) нервной трубки несколько BMP белков, включая BMP4, BMP5, BMP7 и Dsl1, экспрессируются в перекрывающихся областях дорзальной средней линии и индуцируют развитие набора сенсорных интернейронов в дорзальной половине спинного мозга, которые генерируются на более поздних стадиях развития. В молекулярных основах становления клеток дорзальной и вентральной половин спинного мозга имеются как общие, так и отличительные черты.

В частности, индуктивные секреторные сигнальные факторы, как уже отмечалось в главе об эмбриональной индукции, передаются от нейронных тканей (нотохорда и эпидермальная эктодерма) клеткам средней линии нервной трубки как будущим вентральным, так и дорзальным производным. Однако формирование вентрального паттерна, во всяком случае у высших позвоночных, регулируется одним Hedgehog белком, – *Shh*, в то время как в дорзальной половине нервной трубки, как и в эпидермальной эктодерме, экспрессируются BMP белки. В связи с этим белки TGF семейства, передаваемые из эпидермальной эктодермы в нейроэктодерму в местах контакта этих закладок могут проявлять качественно разную индуктивную активность в зависимости от того, с какими из BMP рецепторов они взаимодействуют. С этим же связаны и временные изменения ответа на один и тот же индуктивный стимул, что способствует становлению разнообразия типов дорзальных нервных клеток.

Дифференцировка вентральных типов нервных клеток происходит под контролем *Shh* гена, благодаря его локальному и прямому действиям.

Среди вентральных типов клеток ведущими являются моторные нейроны, которые подразделяются на субклассы в зависимости от того, какую мишень они иннервируют (рис. 5.12).

Как показано на рисунках, в различных субклассах мотонейронов функционируют различные регуляторные генетические элементы, в частности, транскрипционные факторы класса *Lim* гомеодоменов и *Isl*-гены. В частности, у эмбрионов цыпленка самым ранним маркером дифференцирующихся моторных нейронов является ген *Isl* (*Isl-1*), член субсемейства гомеобоксных генов, присоединяющийся к энхансерному элементу, содержащий цистеин богатый *Lim-11*, *Isl-1 Mec-3* (LIM) домены. Другие члены этого семейства включают *Lim-11* и *Mec-3*, которые регулируют детерминацию клеток у *Caenorhabditis elegans*.

Фенотипическое разнообразие моторных нейронов зависит от локальных сигналов, которые действуют на дифференцирующиеся клет-

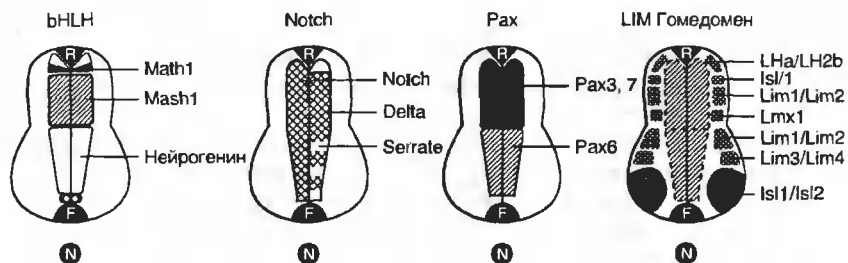


Рис. 5.12. Дорзовентральная регионализация в развивающемся спинном мозге. Эта регионализация определяется различными комбинациями bHLH белков, Notch лигандов и Pax белков.

Правая диаграмма показывает, что наборы нейронов, производных из различных "домов", различаются по экспрессии белков LIM гомеодомена. Моторные нейроны (вентральная область) экспрессируют Isl1/Is2, дорзальные комиссуральные нейроны экспрессируют LH2a/LH2b, дорзальные ипсилатеральные интернейроны экспрессируют Isl1. Моторные нейроны могут быть в последующем дополнительно подразделены в результате действия белков комплекса LIM гомеодомена. По Tanabe, Jessel, 1996.

ки нервной трубки. Трансплантация сегментов нервной трубки цыпленка в различные ее регионы вызывает морфологическую и молекулярную трансформацию клеток трансплантата, включая изменения в экспрессии белков гомеодомена Lim соответственно их новому пространственному расположению.

Подобным же образом инверсия нервной трубки на люмбарном (поясничном) уровне ведет к респецификации моторных нервных клеток соответственно их новому положению, что определяется изменениями в паттерне проекций моторного аксона на периферии. Транслокации и инверсии нервной трубки изменяют также экспрессию Nox генов, что свидетельствует о включенности Nox генов в детерминацию субтипов моторных нервных клеток в спинном мозгу, как и в заднем мозгу. Сходная ситуация имеет место и у рыбки Данио (zebra fish), у которой трансплантация индивидуальных первичных моторных нейронов в различные интрасегментарные позиции также вызывает изменения подтипа моторного нейрона в соответствии с его новым положением, что сопровождается изменением экспрессии белка LIM и респецификацией траектории аксона.

Таким образом, сегментарная спецификация нервных клеток у позвоночных сопровождается соответствующей спецификацией в функционировании их гомеодоменов.

У дрозофилы сегментация центральной нервной системы выражена более отчетливо, и эта сегментарная специфичность также регулируется определенными комплексами генов, в первую очередь гомеозисных, и, в частности, от ANT-C и BX-C групп. Входящие в эти комплексы гены активно транскрибируются в нервной системе, что свидетельствует об их существенной роли в ее формировании. Эта активность составляет часть событий, регулирующих сегментоспецифические свойства нейронов.

1. Делеция *ВХ-С*, при наличии которой развитие происходит до поздних эмбриональных стадий, обуславливает трансформацию абдоминальных сегментов в торакальные. Что происходит при этом с нейронами сегментарных ганглиев? Приобретают ли они черты, свойственные торакальным нейронам, или сохраняют свои свойства? Оказывается, делеция *ВХ-С* индуцирует наряду с трансформацией эпидермиса сегментов, также и определенную трансформацию нейронов, по крайней мере одного из их качеств – все они становятся темноокрашенными на гистологических препаратах, что свойственно в норме только нейронам торакальных ганглиев. Отсюда можно заключить, что во всяком случае часть сегментоспецифических свойств нервной клетки генетически детерминирована. Предполагается, что эти сегментоспецифические особенности определяются уже на стадии бластодермы и, следовательно, обусловлены функциональной активностью соответствующих генов внутри предшественников нервных клеток.

2. В связи с этим встает достаточно общий вопрос – в каких границах сегментоспецифические особенности нейрона, паттерн распространения его отростков, их ветвления, особенности образуемых ими синаптических контактов и т.д. определяются функциональной активностью его собственного генетического аппарата? Возможность фенотипической варибельности ветвления отростков одних и тех же нервных клеток даже у особей с идентичным генотипом выявлена при изучении хода нейрональных отростков и их ветвления у особей изогенных линий дафний, саранчи *Shistocerca nitens*, тропической рыбки *Poecilia formosa*, одного клона нематоды *Caenorhabditis elegans*.

В то же время известно что разрастание отростков нервных клеток происходит вдоль как бы преформированных путей, проложенных так называемыми пионерскими нейронами или влияниями смежных тканей (см. ниже) и, следовательно, роль морфогенетических взаимодействий достаточно заметна.

Удобной моделью для анализа этой проблемы оказались гомеозисные мутации дрозофилы. С их помощью, в частности, удалось проанализировать степень генетической детерминированности центральной проекции колоколообразных сенсилл при трансформации крыльев в гальтеры.

Колоколообразные сенсиллы – это чувствительные структуры, ответственные за восприятие механических раздражений. Такие сенсиллы обнаружены в основании крыльев (W) и гальтеров (H), они образуют довольно мощные пучки волокон внутри центральной нервной системы (ЦНС). При этом все отростки, образованные одной группой нейронов, следуют в пределах одного и того же пути. Проекции из W- и H-сенсилл очень сходны, однако с двумя выраженными различиями: 1) W-проекция имеет контрлатеральную ветвь, которая полностью отсутствует в H-проекции; 2) W-проекция распространяется дальше в глубь мозга.

Можно было бы предполагать, что сегментоспецифичность W- и H-проекций детерминирована не собственно активностью генов соответствующих нейронов, но является результатом различий в месте входа W- и H-аксонов в ЦНС. Однако известны случаи смещения H-аксо-

нов, которые тогда вступают в ганглий в зоне, свойственной W-аксонам. Тем не менее их проекция сохраняет характеристику Н-типа. Следовательно, различия между W- и Н-проекциями определяются внутренне присущими соответствующим нейронам свойствами и зависят от их сегментоспецифической детерминации. В таком случае у двойных мутантов *bx rbx* с трансформированными в крылья гальтерами следовало ожидать и трансформацию проекций сенсилл. Это, однако, не подтвердилось – мутации, использованные в опыте трансформировали лишь эпидермальные клетки, не затрагивая чувствительные нейроны, т.е. данные функционирующие генетические элементы включены в сегментарную детерминацию эпидермиса, но не нейронов. В то же время в опытах, где ту же W- и Н-эпидермальную трансформацию получали с помощью мутаций гена *trithorax* (*trx*), активирующего комплекс *VX-C*, а также с помощью обработки ранних эмбрионов парами эфира, мешающими этой активации, наблюдали трансформацию Н-нейронов, становящихся W-подобными.

Детальные гистологические исследования трансформированных структур ЦНС в метаторакальном ганглии мутантов *bithorax* также свидетельствуют в пользу вторичной природы зарегистрированных изменений. Обнаруженные на гистологических препаратах сверхчисленные ветви могли возникнуть благодаря дополнительным сенсорным волокнам из гомеозисных придатков, обеспечивающим новые проводники для постсинаптических дендритов. Поэтому нисходящие отростки интернейронов, образующие окончания на них, также обнаруживают необычное повышенное ветвление. Если все постсинаптические элементы обеспечивают такую проекцию гомеозисных зон в ЦНС, то их сверхчисленные ветви существенно способствуют увеличению третьего торакального ганглия у мутантов *bithorax*. Иными словами, в этих условиях генетически детерминированные изменения обусловлены не изменениями функциональной активности генов в изменивших свою морфологию нейронах, а изменениями хода морфогенетических процессов вне пределов самого ганглия, которые связаны с изменением активности генов не ганглиозных, а периферических нейронов.

Таким образом, для реализации сегментоспецифического паттерна нейрона, кроме активности в нем собственной “сегментоспецифической” геновой системы, требуется еще и взаимодействие генов, в том числе функционирующих в клетках, расположенных вне ганглия, а значит, весь процесс с точки зрения его молекулярно-генетического обеспечения является достаточно сложным.

Кроме функционального участия собственной генетической системы нейрона, на реализацию его сегментоспецифического фенотипа влияют, следовательно, функционально активные генетические комплексы смежных нейронных сетей и окружающих тканей на уровне морфогенетических взаимодействий, т.е. через эти взаимодействия. Влияние этого уровня у насекомых достаточно велико. При этом в морфогенетических и пластических свойствах нервной системы насекомых обнаружены типичные параллелизмы с нервной системой позвоночных. К таковым относится, например, зависимость размеров

структур нервной системы от размеров рецепторного поля. Это наблюдается, в частности у мутантов *bithoraxoid* (*bxd*), у которых первый абдоминальный сегмент трансформирован в торакальный, в результате чего развивается дополнительная пара конечностей. У подобных мутантов наблюдаются сверхчисленные нейромеры, сегменты торакального ганглия. Зависимость в данном случае однако непростая. Феногенетические механизмы реализации мутации *bxd* зависят от специфических свойств конкретного аллеля гена *bxd*. Например, у мух *bxd100* дополнительные нейромеры формируются, даже если не возникают дополнительные ноги, в то время как у мух *bxd1* ЦНС не обнаруживает заметной трансформации даже в случае развития двух дополнительных конечностей.

Зависимость организации центра от специфичности рецептивных полей продемонстрирована также на примере полового диморфизма моли *Manduca sexta* в развитии обонятельных путей. У многих насекомых установлено наличие в антеннах длинных волоскоподобных ольфакторных сенсилл, отсутствующих у самок (так называемые трихоидные сенсиллы). Их наличие определяет особенности полового поведения самцов, реагирующих на запахи самки и летящих по направлению к ней. В соответствии с этими особенностями периферического сенсорного аппарата устроена и ЦНС, различающаяся у самцов и самок, а именно в мозге самцов присутствует так называемый макрогломерулярный комплекс, которого нет у самок. В изящных экспериментах, проведенных на *Manduca sexta*, было обнаружено, что образование этого комплекса в ЦНС обязательно рецептивным волокнам, “посылаемым” в центр трихоидными сенсиллами. Если трансплантировать антеннальные имагинальные диски самцов в головы личинок самок вместо одного из ее собственных антеннальных имагинальных дисков перед окукливанием, то из подопытных животных развиваются гинандроморфы. При этом в антеннах, развившихся из трансплантата, дифференцируются трихоидные сенсиллы. В соответствии с этим в области мозга самок, куда они проецируются, возникает несвойственный самке макрогломерулярный комплекс, и в поведении таких самок проявляются самцовые черты – они реагируют на запах самок и подобно самцам летят в направлении источника запахов (рис. 5.13).

В данном случае морфогенетические процессы, протекающие в ткани мозга, зависят от функционирования генетической системы, которая детерминирует образование специфических рецепторных зон на периферии. У *Drosophila melanogaster* эта система представлена кластером генов, локализованных в X-хромосоме.

Таким образом, если задать вопрос, детерминировано ли генетически наличие макрогломерулярного комплекса у самцов и отсутствие его у самок, то можно ответить – нет, генетически детерминирована специфичность строения антеннальных сенсилл у самцов, а образование специфических для самцов макрогломерулярных комплексов в мозге является следствием автоматически разворачивающихся именно таким способом морфогенетических процессов. Данный случай является еще одним примером зависимости дифференцировки нейральных центров от

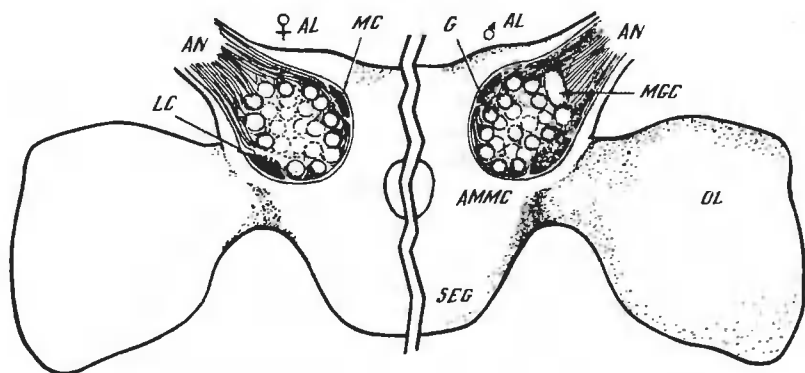


Рис. 5.13. Различия в организации мозга самцов (справа) и самок (слева) *Manduca sexta*.

AMMC – антеннальный механосенсорный и моторный центр, AN – антеннальный нерв, G – гломерулус, LC и MC – латеральный и медиальный кластеры клеточных тел нейронов антеннальной доли, OL – оптическая доля, SEG – субэзофагеальный ганглий, MGC – макрогломерулярный комплекс. По Schneiderman, Hildebrand, 1985.

функций генов в клетках, расположенных вне этих центров, но связанных с ними посредством морфогенетических процессов.

Интерпретация процессов нейрогенеза с точки зрения участия многих генов, функционирующих в разных регионах развивающейся нервной системы и взаимодействующих на многих уровнях, позволяет решить некоторые дискуссионные проблемы молекулярной нейробиологии.

1. В описанном выше случае генетически детерминирован определенный набор компонентов в определенной области мозга (до поры до времени более или менее сходный у самцов и самок), генетически детерминирована специфичность строения антеннальных сенсилл у самцов и, следовательно, специфичность морфогенетических стимулов, посылаемых из этой точки периферии в соответствующий пункт центра. Данный специфический стимул организует реализацию одного из возможных путей морфогенеза в данном нервном центре уже вне зависимости от функциональной активности специфических комплексов генов в самих неравных клетках развивающегося нервного центра (самцовые или самочные, неважно). Лишь в результате реализации индуцирующих влияний периферических отростков в соответствующих нервных клетках, образующих под этим влиянием какое-либо нервное ядро, включаются новые гены, обеспечивающие развитие нейрона в определенный клеточный тип.

2. Отпадает, таким образом, постоянно возникающий вопрос, достаточно ли информации, содержащейся в геноме, для обеспечения всех особенностей конструкции мозга. Достаточно. Дело в том, что в геноме записаны лишь некоторые ключевые моменты, реализация которых обеспечивает: 1) наличие исходного набора компонентов в

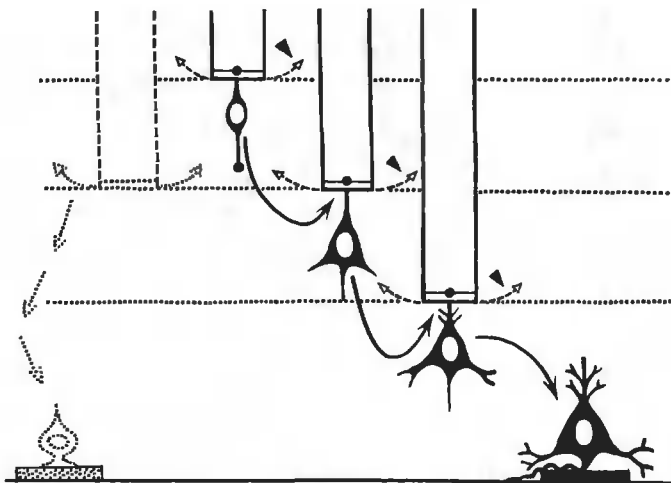


Рис. 5.14. Принцип “качелей”. Объяснение в тексте. По Корочкину.

определенном количестве (размер мозга, размер рецептивного поля, количество циклов деления клеток–предшественников нейронов и т.д.), 2) независимо от этого наличие среди некоторых компонентов специфичности того или иного уровня (развитие в определенном месте или (и) в определенное время, синтез определенного типа белков и медиаторов и т.д.).

Дальнейший нейрогенез основывается на формировании связей между компонентами. Различия хотя бы по одному из них достаточно, чтобы обеспечить в высшей степени специфическое установление морфогенетических и функциональных взаимодействий, которые на разных этапах своего развития не требуют уже вмешательства генетических систем или сопровождаются скорее ингибированием, чем активацией нейроспецифических генов (что, например, наблюдается при детерминации эргичности клетки, когда на ранних стадиях дифференцировки клетка способна приобрести по крайней мере не один тип эргичности и синтезирует наборы соответствующих мРНК, затем остается активным только тот ген (или гены), которые отвечают именно за данный, например, холинергический тип нейрона, а скажем, “адренергические” гены ингибируются).

Следовательно, дифференцирующая нервная клетка как бы качается на “качелях выбора” (рис. 5.14), так что на ранних стадиях дифференцировки целый ряд систем генов, ответственных за формирование определенного типа эргичности, находится в состоянии функциональной готовности. В ходе установления межнейронных связей и образования нейронных ансамблей активность этих генетических систем тормозится, за исключением одной, которая и формирует тип эргичности дифференцирующейся нервной клетки.

Что касается паттерна формирования межнейронных связей, то су-

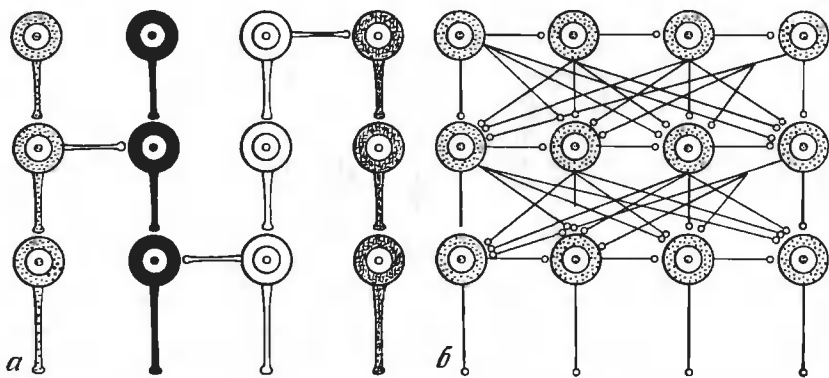


Рис. 5.15. Сопоставление (упрощенно схематическое) детерминистической (а) и стохастической (б) моделей нейрогенеза. По Корочкину.

а – установление связей между разными системами осуществляется не случайно, а детерминированно и в результате “вмешательства” дополнительных факторов или через дополнительные системы нейронов (на схеме не показано).

б – эти связи формируются в силу взаимодействия “всего со всем”. Образование специфических нейронных ансамблей осуществляется на основе вероятностных процессов и является вторичным (в отличие от первого варианта, где оно первично) и определяется не морфогенетическими (как в детерминистической модели), а функциональными параметрами.

существует две модели, объясняющих его: детерминистическая и стохастическая (рис. 5.15).

Эти две системы характеризуются следующими особенностями.

I. Детерминистическая модель.

1. Детерминация клеток в нейральном направлении осуществляется рано.

2. Специфическая эргичность нейронов и их принадлежность к определенному структурно-функциональному типу детерминируется очень рано.

3. Установление связей между дифференцирующимися нервными клетками не случайно, а строго специфицировано.

II. Стохастическая модель.

1. Детерминация клеток к развитию в нейральном направлении осуществляется поздно.

2. Специфическая эргичность нейронов и их принадлежность к определенному структурно-функциональному типу детерминируется поздно.

3. Установление связей между дифференцирующимися нервными клетками случайно.

Имеющиеся в настоящее время данные в большей мере свидетельствуют в пользу детерминистической модели.

1. Развитие животных в условиях, предотвращающих функционирование нервной системы, не отражается на становлении специфических нейральных связей. Например, правильное формирование мозга и обра-

зование специфических межнейронных контактов у амфибий происходят в условиях глубокой кураризации, блокирующей передачу импульсов между нейронами. После выхода из наркоза подопытные личинки не отличались по поведению от нормальных.

2. Если перерезать дорзальные корешки спинного мозга у угря, то оказывается, что, несмотря на деафферентацию, угорь сохраняет способность к хорошо координированным плавательным движениям. Это, очевидно, означает, что плавательные движения полностью детерминированы и запрограммированы во внутренних межнейронных связях центральной нервной системы и выполняются независимо от внешних раздражений. Сходные данные получены на деафферентированных головастиках, жабах и рыбах.

3. Очень демонстративны опыты Роберта Сперри. Он поворачивал у амфибий глазное яблоко на 180° вокруг оптической оси, не повреждая зрительного нерва. Глаз приживляется, но при этом спинной квадрант сетчатки расположен в обратном направлении по отношению к орбите, а височный повернут к нему. Соответственно извращались зрительные реакции, так что нападение на мелкие движущие объекты направлено к соответствующим точкам противоположного квадранта поля зрения по отношению к тому, в котором расположена приманка.

Сходные результаты были получены в опытах на личинках шпорцевой лягушки. Если на стадии 53, перед самым метаморфозом, удалить роstralную или каудальную половину тектума и затем сохранять животное так, чтобы оно прожило несколько месяцев после метаморфоза, то окажется, что только соответствующая часть сетчатки (поля зрения) проецируется на сохранившуюся поверхность тектума. Не имеет значения, какая половина тектума удаляется в поздней личиночной стадии развития, во всех случаях связи образуются только с надлежащим участком тектума. Следовательно, в этой ситуации проекция лишена пластичности, что опять же свидетельствует о существовании жесткого, немодифицируемого механизма специфичности, действующего при установлении ретино-тектальных связей.

Становятся известными и молекулярно-генетические основы этого механизма, выявляемые при исследовании механизма нахождения нервными волокнами их мишеней и при поисках тех маркеров, которые как бы направляют нервные волокна на пути к их мишеням.

У дрозофилы и у саранчи было обнаружено, что каждый дифференцирующий нейрон образует отростки, следующие по определенному, строго детерминированному пути, распознавая соответствующий нервный пучок и присоединяясь к нему. Маркерами, позволяющими опознать нужный пучок или даже отдельный нерв, являются нейроспецифические поверхностные антигены, синтезируемые в нужный отрезок времени как бы для того, чтобы проложить пути отросткам родственных нейронов.

Их рост и установление межнейронных и нейротканевых связей в онтогенезе, как уже отмечалось, осуществляются по детерминистическому принципу, т.е. отростки нервных клеток движутся не случайным образом, но по точно обозначенным "магистральям". Важную роль в

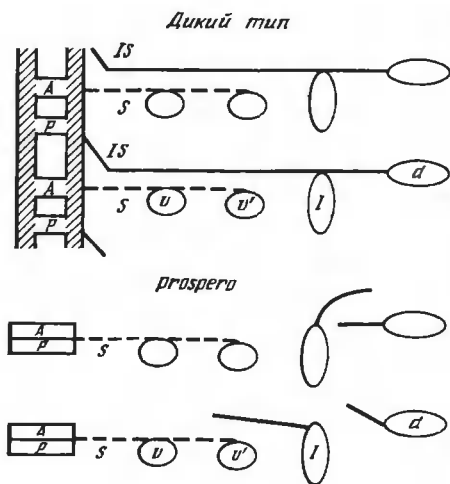


Рис. 5.16. Воздействие гена *prospero* на морфологию аксонов центральной и периферической нервной системы эмбрионов дрозофилы. По Doe et al., 1991.

У мутантных эмбрионов не развиваются продольные пучки (коннективы) нервных волокон (L) в торакальном ганглии, а поперечные коннективы, передняя (A) и задняя (P) – часто сливаются. В связи с этим изменяется направление роста отростков сенсорных нейронов. Отростки сенсорных нейронов (S) из v и v^1 – кластеров часто растут в центральную нервную систему нормально, в то время как отростки d и i сенсорных нейронов обычно дезориентированы. IS – интерсегментальные нервы.

этом процессе играют пути, проложенные нейронами, дифференцирующимися первыми, так называемыми “пионерскими” нейронами.

Вдоль этих путей распространяются пучки нервных волокон, образуемых нейронами, развивающимися во “вторую очередь”. Если в эксперименте убить пионерскую клетку лазерным лучом или если она пострадает в результате мутации соответствующего нейрогена, например, *prospero* у *D. melanogaster* (рис. 5.16), то рост отростков соответствующих “вторичных” нейронов приобретает хаотический характер.

Точно так же существуют преформированные пути для продвижения покинувшего основной нервный пучок волокна (или группы волокон) к иннервируемой мишени (мишеням). При этом следует отметить, что аксонам нервных клеток приходится преодолевать достаточно большие расстояния, в несколько сантиметров и более, превышающие более чем в 1000 раз размер перикариона (тела нервной клетки). Это упрощается тем, что траектория аксона распадается на короткие сегменты, каждый из которых равен нескольким сантиметрам длины. В индивидуальных сегментах аксоны часто заканчиваются на специальных клетках, которые являются промежуточными мишенями для них. Таким образом, долговременная “навигация” облегчается наличием на пути следования отростка многочисленных промежуточных “пунктов”. У насекомых некоторые промежуточные мишени образованы небольшими кластерами “проводящих клеток”, удаление которых вызывает “потерю ориентации” аксонами, которые в норме с ними контактируют.

Следовательно, аксоны продвигаются к мишени “направленным” способом. Что же “заставляет” их двигаться подобным образом? Еще Рамон-и-Кахаль предполагал, что это – градиент распределения различных химических аттрактантов, которые привлекают определенный тип нейральных отростков и которые, возможно, секретируются промежуточными и конечной мишенями.

В настоящее время, когда становятся известными некоторые фак-

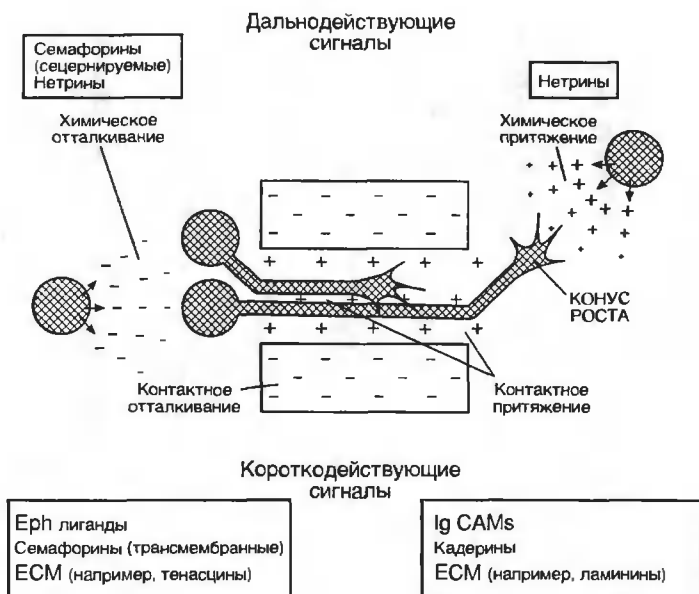


Рис. 5.17. Силы, определяющие направление движения аксонов нервных клеток. По Tessier-Lavigne, Goodman, 1996.

Механизмы четырех типов вносят свой вклад в "управление" движением конуса роста: контактное "привлечение" (притяжение), химическое "привлечение", контактное притяжение, контактное отталкивание. На схеме представлены основные факторы, включенные в эти механизмы.

ты из области молекулярных основ направленного роста отростков нервных клеток, эта точка зрения находит подтверждение, в частности, в связи с доказательством участия молекул экстрацеллюлярного матрикса (ЕСМ) в этом процессе (рис. 5.17).

Обнаружены многочисленные лиганды и рецепторы, участвующие в регуляции направленного движения аксонов нервных клеток.

Первым идентифицированным диффундирующим аттрактантом был нетрин, тесно родственные ламининам, ЕСМ (экстрацеллюлярный матрикс) молекулам.

Затем стало известным семейство самафоринов, которое содержат белки клеточной поверхности и диффундирующие белки, являющиеся соответственно коротким и длинным репеллентом. Кроме того, различные "проводящие" молекулы бифункциональны, они привлекательны для одних аксонов и оказывают отталкивающее влияние на другие. Различия в этом ответе зависят от тех рецепторных молекул, которые экспрессируются в конусе роста.

Известно множество типов молекул, принимающих участие в регуляции движений конуса роста и установления межнейронных и нейротканевых связей:

1. Два больших семейства молекул клеточной адгезии (СAM) функ-

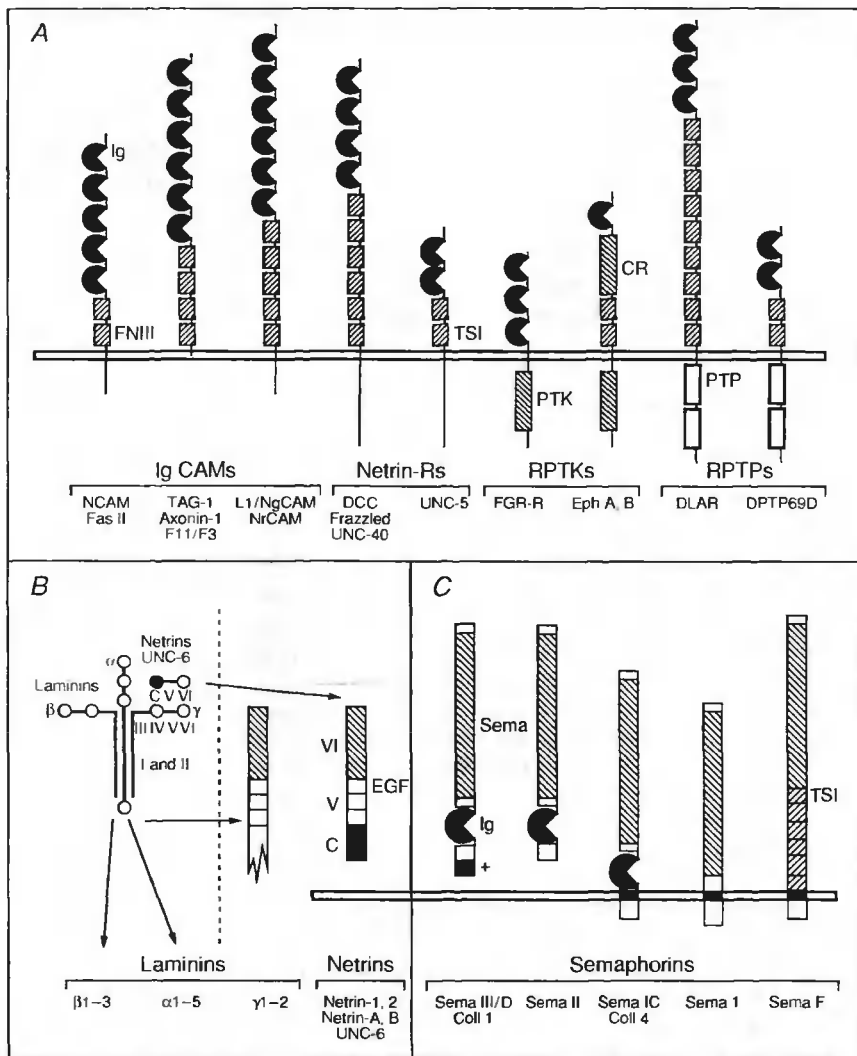


Рис. 5.18. Молекулы, которые модулируют рост аксона.

A – представители различных субсемейств суперсемейства иммуноглобулинов (IG), включая рецепторный белок протеин киназы (PRTKs) и рецепторный белок тирозинфосфатазы (RPTPs), вовлеченные в управление ростом аксона. Некоторые члены суперсемейства иммуноглобулинов имеют экстрацеллюлярные домены и домены фибронектина III (FNIII). Некоторые члены субсемейства были идентифицированы как адгезионные молекулы (CAMs), другие – как “проводящие” рецепторы аксона (например, UNC-40 и UNC-5). Некоторые члены иммуноглобулинового суперсемейства сцеплены с клеточной мембраной GPI якорем. TSI – домен тромбоспондина 1-го типа. CR – цистеин-богатая область. PTP – домен белка тирозинфосфатазы.

B и **C** – семейства ламинина, нетрина и семафорина, члены которых консервативны, найдены у нематод, насекомых и позвоночных и являются “проводниками” аксона. Ламинины представляют собой гетеротримерные, крестообразные гликопротеиновые комплексы с составляющими их цепями, названными альфа, бета и гамма. У позвоночных имеет-

ционируют в ходе продвижения аксона: иммуноглобулин (Ig) и cadherin суперсемейства. Известно около 10 CAM у дрозофилы и около 50 – у млекопитающих. Члены этого семейства могут функционировать двояко – и как лиганды в одной клетке и как рецепторы – в другой (рис. 5.18).

2. Рецепторный белок тирозинкиназы (RPTKs).

Множество RPTKs модулируют рост аксона и регулируют установление контакта с мишенью. У позвоночных это рецепторы фактора роста фибробластов (FGF) и семейство Trk рецепторов нейротрофинов. При этом нейротрофиновые рецепторы вовлечены в регуляцию ветвления аксонов.

3. Рецепторный белок тирозин фосфатазы (RPTRs). У дрозофилы с помощью генетического анализа было найдено несколько RPNR, вовлеченных в контроль ветвления аксона. RPTR beta связывает IgCAM contactin/F11, подтверждая возможность двунаправленной связи между CAM и RPTRs.

4. Молекулы экстрацеллюлярного матрикса и их рецепторы. Многие ECM молекулы функционируют как промоторы или, напротив, как ингибиторы разрастания нейритов (аксонов). К таковым относятся ламинин, тенасцин, коллаген, тромбоспондин семейства, а также фибронектин, витронектин, множество протеогликанов.

Рецепторами ECM молекул в большинстве случаев являются интегрины, члены суперсемейства Ig и протеогликаны.

Некоторые протеогликаны могут функционировать как лиганды, тормозящие разрастание аксонов. У дрозофилы отсутствие функции ламинина A вызывает остановку сенсорных аксонов. Очевидно, ламинин является перmissive субстратом для этих аксонов. У человека мутация KAL1 гена, который кодирует малый ECM белок, вызывает дефекты, наличие которых подтверждает роль KAL1 продукта как перmissive субстрата для олифакторных аксонов.

5. Нетрины и их рецепторы.

Это маленькое семейство бифункциональных guidance cues, способных привлекать одни аксоны и отталкивать другие. Нетрины – это белки, содержащие примерно 600 аминокислот, родственных ламининам. Они диффундируемы, но степень их диффузии определяется взаимодействием с клеточной поверхностью или ECM.

Члены ДСС субсемейства суперсемейства Ig являются компонентами рецепторов, которые опосредуют аттрактивный эффект нетринов.

6. Семафорины.

Это – большое семейство белков клеточной поверхности и секретруемых белков, которые функционируют как хеморепелленты или ингибиторы. Семейство характеризуется наличием консервативного (примерно 500 аминокислот) экстрацеллюлярного семафорин домена. Изве-

← по крайней мере пять альфа, три бета и две гамма цепи. Нетрины родственны аминокислотным доменам VI и V цепям ламинина. Большинство семафоринов имеют длину в 750 аминокислот, с 500 аминокислотами, приходящимися на долю семафоринного домена. В некоторых субсемействах семафоринный домен смежен иммуноглобулиновому домену. Одно субсемейство содержит члены длиной в 1000 аминокислот с последующим набором тандемов тромбоспондинового домена. По Tessier-Lavigne, Goodman, 1996.

стно пять различных субтипов семафоринов, включая секретируемые и трансмембранные члены семейства.

Коллапсин I/семафорин III/D позвоночных является индуктором коллапса сенсорного конуса роста и в качестве диффундирующего хеморепеллента вовлечен в определение паттерна проекции сенсорных аксонов в спинном мозгу.

Коллапсин, помимо всего прочего, предотвращает разбиение конуса роста на множество тонких веточек (филоподий).

У насекомых семафорины специфически тормозит ветвление отростков и формирование синаптических ветвей.

Известен ген, который играет специфическую роль в движении постмитотических нейронов. Он кодирует специфический белок астротактин, поддерживающий нейронную миграцию вдоль глиальных волокон. Ген, кодирующий астротактин, детерминирует белок с тремя повторами EGF (эпидермальный фактор роста) и двумя повторами фибронектина IV.

Этот белок определяет, в частности, миграцию клеток-зерен мозжечка в культурах *in vitro*. Астротактиновая мРНК экспрессируется в постмитотических нейрональных предшественниках в мозжечке, гиппокампе, *cerebrum* и *olfactory bulb*, где посредством миграции организуется ламинарная структура.

Fab антитела к рекомбинантному астротактин пептиду блокируют миграцию клеток-зерен мозжечка *in vitro* вдоль волокон астроглиальных клеток.

Различные виды аттрактантов и репеллентов могут воздействовать на конус роста аксона на разном расстоянии. Из них нетрины – наиболее распространенные хемоаттрактанты и хеморепелленты. Их аттрактантное действие опосредуется механизмом, включающим членов ДСС субсемейства Ig суперсемейства. Комиссуральные аксоны, связующие правую и левую половины центральной нервной системы, экспрессируют белок UNC-40 у *C. elegans*, *Frazzled* у *Drosophila* и DCC у млекопитающих.

ДСС позвоночных может связывать нетрин-1 и требуется для аттрактивной функции нетрина в условиях *in vitro*. Нетрины, очевидно, оказывают направляющее влияние на рост аксонов, поскольку утрата их функции вызывает *misrouting* в движении комиссуральных аксонов.

На некоторые аксоны нетрины действуют как репелленты. У *C. elegans* мутация гена, кодирующего нетрин UNC-6, вызывает эффект отталкивания мигрирующего аксона в дорзальном направлении, прочь от источника этого нетрина. Подобно этому у позвоночных нетрин-1 отталкивает некоторые моторные аксоны, которые в результате отклоняются дорзально от источника нетрина-1.

В процессе своего продвижения к мишени конусу роста приходится принимать различные “решения” в зависимости от специфичности тех хемоаттрактантов и хеморепеллентов, с которыми он встречается.

У эмбрионов цыпленка выявлены два Ig CAMs в тех аксонах, которые пересекают среднюю линию; *axonin-1* и *NrCAM*. Комиссуральные аксоны и конусы роста экспрессируют аксонин-1, в то время как клет-

ки, формирующие среднюю линию (floor plate cells), экспрессируют NrCAM.

Введение эмбрионам цыпленка *in vivo* реагентов, которые нарушают взаимодействие аксонина-1 с NrCAM вызывает ошибки в комиссуральных конусах роста, так что около 50% аксонов выбирает не контрлатеральный путь и пересечение средней линии, как обычно в норме, но двигаются ипсилатерально вдоль границы floor plate и не пересекают средней линии.

В культурах *in vitro* под влиянием агентов, блокирующих взаимодействие аксонина-1 с NrCAM, наблюдается коллапс конуса роста. Отсюда следует, что floor plate cells экспрессируют на своей поверхности ингибирующий фактор, функция которого в норме маскируется NrCAM, детектируемым рецептором конуса роста при посредстве аксонина-1.

Как функционирует ингибитор, вырабатываемый клетками средней линии? Оказалось, что он предотвращает повторное пересечение комиссуральными аксонами средней линии после того, как они пересекли ее один раз. Аксоны при этом приобретают чувствительность к ингибитору во время или после перекреста. У крысы это достигается регулирующей экспрессии аксонина-1, у дрозофилы регулирующей экспрессии или функции рецептора к ингибитору средней линии. В частности, у дрозофилы ген *roundabout (robo)* кодирует трансмембранный белок, который функционирует автономно в комиссуральных нейронах и является частью рецепторного механизма для репеллентов средней линии. У мутанта *robo* многие конусы роста аксонов, которые в норме распространяются только ипсилатерально (на своей стороне), переходят вместо этого через среднюю линию и разрастаются на контрлатеральной стороне, а аксоны, которые в норме пересекают среднюю линию только один раз, делают это многократно.

Мутации гена *comissureless (comm)* дрозофилы, кодирующего белок с трансмембранным доменом, экспрессирующимся в нервных клетках средней линии и взаимодействующим с комиссуральными аксонами, дают противоположный эффект: конусы роста комиссуральных аксонов сначала ориентируют свое движение по направлению к средней линии, но не перекрещивают ее.

Одним из важных моментов в установлении межнейронных связей и нейротканевых отношений является формирование нервных пучков, тесно связанных ассоциаций нервных волокон, до поры до времени совместно продвигающихся к мишеням, а затем разделяющихся на все более мелкие ответвления. Что заставляет нервные волокна сначала соединяться вместе, а затем разделяться и двигаться по разным маршрутам? Оказывается, и в этих процессах ключевую роль играют хемоаттрактанты и хемореpellенты. В частности, CAMs, опосредующие адгезию клеток *in vitro*, вовлечены также в опосредование *fasciculation in vivo*. Это показано, в частности, при исследовании у насекомых *Fasciclin II (FasII)* и *Ig CAM*, родственных NCAM позвоночных. У дрозофилы *FasII* экспрессируется в "наборе" аксонов эмбриональной ЦНС, многие из которых собраны в три продольных аксонных пути.

Мутант, у которого соответствующий ген утратил функциональную способность, аксоны не собираются в пучок, в то время как при эктопической экспрессии FasII дефасцикуляция может быть предотвращена, и пучок нервных волокон, который должен был разделиться на отдельные ветви, остается цельным.

Важную роль в образовании пучков нервных волокон играет трансмембранный семафорин SemaI, экспрессирующийся в полосках эпителиальных клеток в почке конечности кузнечика. Если функции этого семафорина блокировать антителами, то пара аксонов, которые растут в этой области и в норме расходятся и ветвятся, объединяются вместо этого в пучок.

Таким образом, фасцикуляция (объединение в пучки) нервных отростков определяется балансом аттрактивных и отталкивающих сил, в то время как дефасцикуляция имеет место в случае сдвига в балансе этих сил, в частности, связанного с ростом “non-axonal substrates”.

В этом случае, несмотря на то, что достаточно высокий уровень главных аксонных CAMs поддерживается во время дефасцикуляции, другие факторы сдвигают баланс сил в сторону распада нервных пучков.

Важным регулятором дефасцикуляции у цыпленка является полисиаловая кислота (PSA), углевод, который ковалентно присоединяется к IgCAM NCAM. Моторные аксоны выходят из ЦНС и тесно фасцикулируются и смешиваются, пока они продвигаются и достигают почки конечности. Затем они начинают дефасцикулироваться и расходятся по различным путям и направлениям. Дефасцикуляция вызывается увеличением уровня PSA, обнаруженной на этих аксонах. Энзиматическое удаление PSA ослабляет дефасцикуляцию и вызывает увеличение ошибок проекции аксонов на мишени. Эффект удаления PSA на моторных аксонах может быть обращен добавлением антител к L1/NgCAM. PSA найдена только у позвоночных, где она ассоциируется с событиями, сопровождающими дефасцикуляцию.

Дополнительные сведения о факторах, регулирующих дефасцикуляцию, получены в исследованиях проекции периферических моторных аксонов у дрозофилы. Моторные аксоны сегментарного нерва b (SNb) сначала следуют с аксонами интерсегментарного нерва (ISN), но затем отделяются и формируют отдельный пучок. В норме в моторных аксонах наблюдается высокий уровень экспрессии IgCAM FasII. Когда уровень FasII в аксонах увеличивается трансгенно, SNb аксоны теряют способность к дефасцикуляции в точке выбора. Следовательно, дефасцикуляция моторных аксонов требует модуляции функций FasII. Было обнаружено пять генов, которые кодируют негативные регуляторы функций FasII. Утрата функций этими генами в результате мутаций дает SNb фенотип дефасцикуляции, сходный с таковым при увеличении уровня FasII.

Три белка RPTPs (Dlag, DPTp69D и DPTp99A) экспрессируются в моторных аксонах. Мутации в генах, кодирующих эти продукты (один или в комбинации), дают частично пенетрантный фенотип дефасцикуляции.

Виктор ГАМБУРГЕР. Выдающийся ученый, лауреат Нобелевской премии. Один из основоположников экспериментальной нейроэмбриологии. Под его руководством были начаты работы, завершившиеся открытием Фактора роста нервов (NGF).



Мутации двух других генов – *beaten path* (*beat*) и *sidestep* (*side*) – приводят к сходному фенотипу с более высоким уровнем пенетрантности.

Таким образом, значение некоторых молекулярных событий в организации нервных волокон и направленности их движения в ходе клеточной дифференцировки постепенно проясняется.

Меньше известно о регуляции установления связей нервных волокон с их мишенями. В частности, контакт с мишенью может регулироваться членами семейства факторов роста нервов (NGF) или нейротрофинов. Так, симпатическая иннервация гипофиза и наружного уха контролируется нейротрофином 3 (NT3), фактором, который синтезируется самой мишенью. У мутантов

мышей $\frac{NT3^-}{NT3}$ симпатические волокна приближаются к мишени, но не

устанавливают с ней контакт. Дефект может быть устранен добавлением экзогенного NT3. В ряде других случаев нервные волокна также находят мишень, двигаясь в направлении возрастания градиента концентрации NGF. Точно так же фактор роста фибробластов (FBF) обеспечивает правильную проекцию ретинальных нервных волокон в *tectum opticum* *Xenopus*.

Нейротрофические факторы (NTs) вообще играют важную роль в нейрогенезе, в регуляции выживания и дифференцировки селективных популяций нейронов в ходе эмбрионального развития, а также в поддержании специфических функций этих нейронов у взрослых животных.

В периферической сенсорной и симпатической нервной системе специфические популяции нейронов поддерживаются специфическими NTs, и инактивация генов, их кодирующих, вызывает существенные и характерные дефекты сенсорной и симпатической нервной системы.

Фактор роста нервов (NGF) был открыт в 40–50-е годы, благодаря работам Виктора Гамбургера и Риты Леви-Монтальчини. Оказалось, что если эмбриональный спинальный или симпатический нервный ганглий культивировать рядом с кусочком саркомной ткани, то наблюдается резкая интенсификация роста аксонов ганглия уже через 18 часов инкубации. В контрольном ганглии через этот промежуток времени рос-

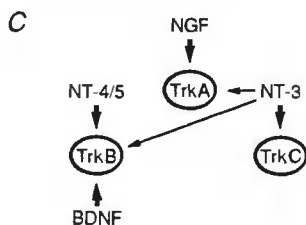
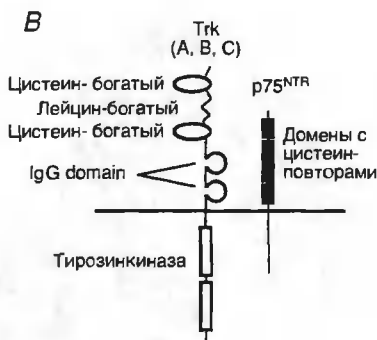


Рис. 5.19. Нейротрофины и их рецепторы.

Все члены NGF семейства (*Nts*) синтезируются как предшественники (A) и процессируются посредством классического дробления с образованием активных *Nts*, которые содержат 50% консервативных доменов. Эти домены распределены главным образом вокруг консервативного цистеинового (C) остатка, который формирует три дисульфидных мостика, существенных для образования трехмерной структуры биологически активных NTs.

K – лизин, R – аргинин. NTs эффекты опосредованы Trk (A, B или C) тирозинкиназным рецептором и p75^{NTR}. (B) Индивидуальные *Nts* (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) прикрепляются к индивидуальным Trk рецепторам (C). Все NTs имеют одинаковое сродство к p75^{NTR}, который усиливает сродство и увеличивает специфичность индивидуальных NTs к их Trk рецепторам (3). По Thoenen, 1995.

та аксонов практически не наблюдалось. За столь выраженный нейростимулирующий эффект был ответственен белок подчелюстной слюнной железы теплокровных, гомологичный продукту ядовитой железы змей, выделяемый в окружающую среду и проникающий в нервные клетки. Этот фактор и был назван Nerve Growth Factor (NGF). Он состоит из пяти субъединиц: две альфа, одна бета и две гамма. Ответственна за эффект роста аксонов только бета-субъединица (рис. 5.19). NGF из змеиного яда содержит только бета субъединицу, сходную по строению с соответствующей молекулой слюнной железы мыши. Обнаружено также сходство NGF с инсулином. Опыты Риты Леви-Монтальчини, а также Ф.З. Меерсона и Л.И. Корочкина показали, что введение новорожденным мышам антител к NGF вызывает торможение развития симпатических и чувствительных ганглиев.

Наиболее выражен эффект NGF на периферическую нервную систему, а именно на симпатические и спинальные (чувствительные) ганглии. Этот нейростимулятор выделяется также клетками ЦНС, особенно активны в этом отношении клетки гиппокампа. Наиболее чувствительны к его действию в ЦНС – холинергические нервные клетки.

Известны два типа рецепторов NGF. Один из них обеспечивает проведение сигнала в нервную клетку, другой ускоряет миграцию Шванновских клеток, окружающих нервное волокно.

Роль NGF в формировании определенных форм поведения не вызывает сомнений. Известно, например, что симпатическая нервная система играет одну из ключевых ролей в становлении иерархических отношений в группе мышей. Понижение функции NGF с помощью 6-оксидофаминина вызывает нарушение этих отношений – в группе не выделяются доминанты, отсутствует борьба за ведущее положение и даже наблюдается гибель животных.

В ЦНС имеется множество индивидуальных нейронов, перекрывающихся по факторам их трофической поддержки. Изменения в функционировании соответствующих генов не вызывают столь драматических нарушений, как в периферической нервной системе.

В противоположность периферической нервной системе нейротрофины (NTs) в ЦНС синтезируются преимущественно нервными клетками и в случае brain-derived-neurotrophic factor (BDNF) и NGF. Количество соответствующей мРНК регулируется нейронной активностью, а также гормональными влияниями.

В гиппокампе и коре головного мозга крыс эта регуляция опосредуется нейротрансмиттерами. Регуляция осуществляется глутаматом через N-methyl-D-aspartate (NMDA) и не NMDA рецепторы в ходе индивидуального развития, а также ацетилхолиновыми (мускариновыми) рецепторами.

Регуляция опосредуется преимущественно (гамма-аминобутировой кислотой (GABA)) через GABA-A.

Содержание NGF и BDNF в клетке зависит от ее физиологической активности, однако количество NT-3 и NT-4/5 прямо не регулируется активностью нейрона.

В то же время синтез BDNF регулируется физиологическими стимулами, в частности, со зрительного входа. Специфическая блокада сенсорного входа в зрительную кору с помощью интраокулярного введения тетродоксина или выдерживания экспериментальных животных в темноте вызывает быструю регуляцию BDNF мРНК. Таким образом, имеются различия в регуляции синтеза нейротрофинов в центре и на периферии. На периферии, например, NGF синтезируется в не-нейральных клетках, регуляция его синтеза и высвобождения не зависит от нейрального входа. Синтез его конститутивен и кальций-независим.

В ЦНС NGF и BDNF, вырабатываемые в нервных клетках, могут синтезироваться как конститутивным, так и зависимым от клеточной активности путем.

Локальное введение BDNF в зрительную кору котенка в критический период развития предотвращает формирование зрительных доминантных колонок и вызывает парадоксальный сдвиг в ответах нейронов зрительной коры (рис. 5.20).

Этот эффект объясняется активацией GABA-содержащих тормозных интернейронов в зрительной коре головного мозга экспериментальных животных, поскольку известно, что GABA-содержащие нейроны экспрессируют TrkB рецепторы. Наблюдаемый эффект мог иметь место благодаря увеличенному синтезу GABA, сопровождаемому "sprouting" содержащих этот нейромедиатор интернейронов и усилен-

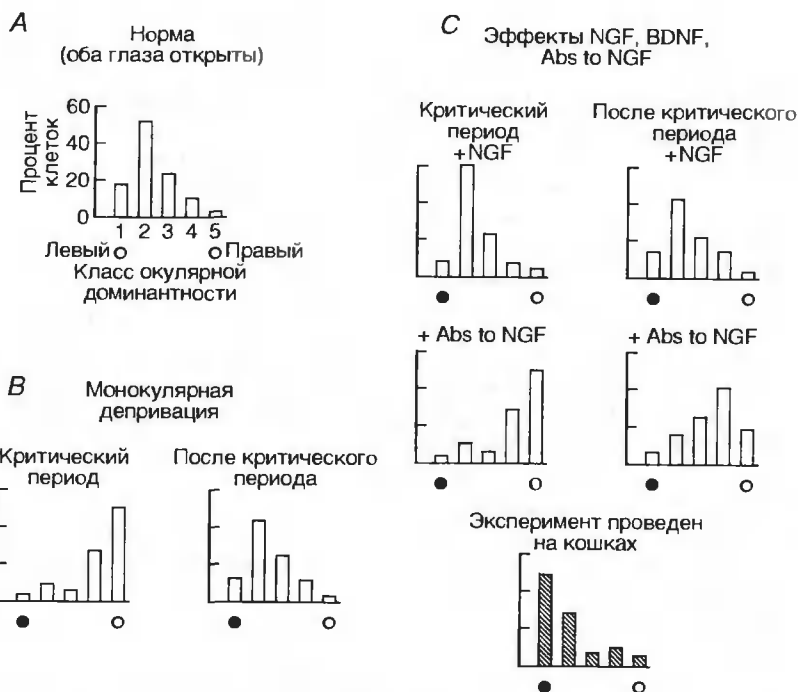


Рис. 5.20. Эффект Nts на глазную доминантность в течение и после критического периода.

Классы глазной доминантности отражают тот факт, что индивидуальные нейроны зрительной коры (поле 17) отвечают за зрительный вход от левого и правого глаза различным способом. Классы 1 и 5-го нейронов ответственны исключительно за зрительный вход слева (класс 1) или справа (класс 5). Нейроны 2-го и 4-го классов ответственны за зрительный вход от обоих глаз, но для класса два предпочтительнее левый, для класса 4 предпочтительнее правый глаз. Нейроны класса 3-го обеспечивают бинокулярный характер зрения. А – во время критического периода (у крыс – постнатальные дни с 15-го по 45-й, у кошек – с 28-го по 72-й) ответственность нейронов может быть двинута. В – данные, анализирующие эффекты NGF и соответствующих антител (Abs) на изменения глазной доминантности, вызванной монокулярной депривацией крыс. С – закрытая сторона глаза отмечена черным кружком (данные на кошках, поскольку данные на крысах отсутствуют). По Thoenen, 1995.

ным высвобождением GABA, по аналогии с увеличением высвобождения нейротрансмиттера из холинергических и глутаматергических нейронов под влиянием NTs через соответствующие Trk рецепторы.

В то же время в ЦНС, как и на периферии, существуют факторы, вырабатываемые не-нейральными элементами, которые оказывают влияние на дифференцировку центральных нейронов. В первую очередь это glial-cell-derived neurotrophic factor (GDNF), необходимый, в частности, для переживания дофаминергических нейронов в среднем мозге.

GDNF – гликозилированный, дисульфид-содержащий гомодимер: принадлежащий к суперсемейству transforming growth factors-beta (TGFs-beta) (рис. 5.21).

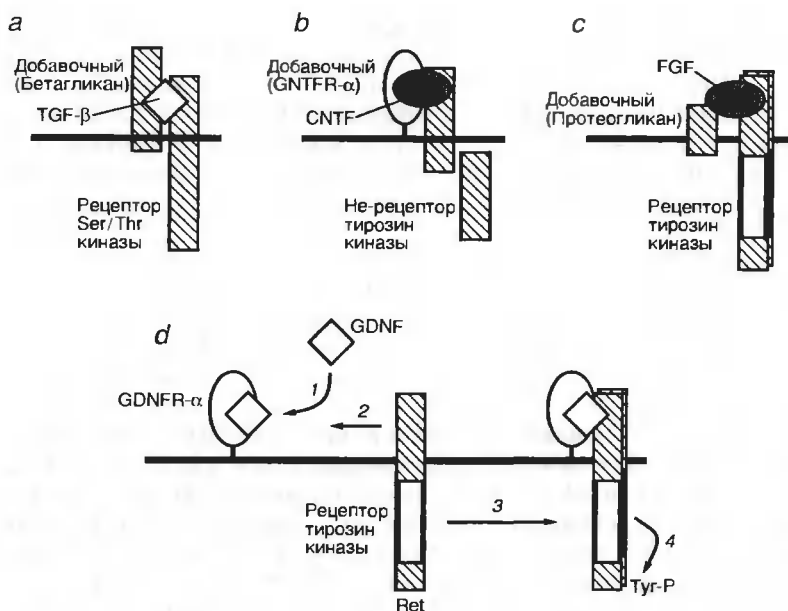


Рис. 5.21. Сравнение сигнальных комплексов трансформирующего фактора роста – бета-TGF(*a*), цилиарного нейротрофического фактора (*b*), фактора роста фибробластов (*c*) и глиа-производного нейротрофического фактора (GDNF) (*d*). GDNF родственен членам семейства бета-TGF, но генерирует комплекс с компонентами других систем: он имеет доступ к тирозинкиназе Ret. GDNFR-альфа, экстраклеточный белок, который прикрепляется к плазматической мембране посредством гликозилфосфатидил-инозитола. На 1-м этапе GDNFR-альфа связывает GDNF и на 2-м – этот комплекс узнается Ret (3). Ret фосфорилируется по тирозину (4), в результате чего формируется сигнал. Из Science, 1995, v. 270, p. 593.

На рисунке показаны строение и эффект этого фактора.

В культурах эмбрионального среднего мозга рекомбинантный GDNF ген способствует выживанию и морфологической дифференцировке дофаминэргических нейронов и увеличивает их высокое сродство к включению дофамина. Эти эффекты относительно специфичны. GDNF не увеличивает тотальное количество нейронов или астроцитов.

Идентифицирован и рецептор GDNF, каковым оказался рецептор тирозин киназы – Ret (c-ret proto-oncogen). Высокий уровень c-ret мРНК экспрессии найден в дофаминэргических нейронах Substantia nigra взрослых животных, где эндогенный GDNF защищал Ret-положительные нейроны от 6-гидроксидофамин-индуцируемой гибели клеток. Нормальная c-ret функция необходима, для GDNF сигнала в периферической нервной системе. Таким образом, продукт c-ret протоонкогена кодирует функциональный рецептор для GDNF, который может опосредовать его нейротрофические эффекты на моторные дофаминэргические нейроны. Известен также партнер Rets – новый, связанный с

глико-липидной мембраной белок, названный GDNFR alpha. Этот белок локализован на поверхности клетки, связывает GDNF и экспрессируется в GDNF-реагирующих тканях. Альфа GDNF оказывается экстрацеллюлярным белком, который прикрепляется к плазматической мембране фосфатидилинозитольным "якорем" (Gpi). Если обработать культуру нейронов *in vitro* фосфатидилинозитол фосфолипазой (PIPLC), которая гидролизует GPI, клетки утрачивают способность ответа на действие GDNF.

Этот результат показывает, что GDNFR альфа участвует в GDNF сигнализировании действием в качестве облигатного партнера сигнального рецептора.

GDNFRalpha, GDNF и Ret способны связываться в единый ассоциат, при этом GDNFRalpha связывает GDNF, и этот комплекс узнает Ret (см. рис. 5.21).

У мутантных мышей с дефектом в экспрессии GDNF (GDNF null мыши) отсутствуют нейроны в области нижнего отдела пищевода, желудка, тонкой кишки или слюно, хотя адренэргические волокна во всех этих областях были обнаружены. Этот морфологический дефект, вызванный утратой функций гена, кодирующего GDNF, объясняет наблюдаемые у мутантных животных стеноз пилорического отдела желудка и дилатацию их duodenum. Однако удаление GDNF гена не влияет на дифференцировку и переживание дофаминэргических нейронов в ЦНС в ходе эмбрионального развития, так что различия в количестве дофаминэргических нейронов в соответствующих отделах ЦНС между контролем и опытом невелики. Сходным фенотипом характеризуются и мыши, дефектные по гену, кодирующему Ret рецептор тирозин протеин киназы.

Таким образом, характер дифференцировки нейронов, включая образование и рост отростков, зависит наряду с прочими факторами от соответствующего уровня активности генов, кодирующих многочисленные нейроростовые и нейротрофические факторы, что еще раз демонстрирует достаточно сложный и **многоуровневый** характер молекулярно-генетической регуляции нейрогенеза, как отмечалось в начале настоящего раздела.

ЛИТЕРАТУРА

- Гейз Р. Образование нервных связей. М.: Мир, 1972.
- Гудман К., Бастияни М. Как эмбриональные нервные клетки узнают друг друга // В мире науки. 1985. № 2. С. 14–23.
- Корочкин Л.И. Нейрогенез и гены // Аналитические аспекты дифференцировки. М.: Наука, 1991. С. 28–55.
- Корочкин Л.И., Оленев С.Н. Механизмы и факторы развития нейронов и межнейронных связей в онтогенезе // Успехи соврем. биологии. 1966. Т. 62. С. 77–96.
- Стивенс С. (ред.). Экспериментальная психология. М.: Изд-во иностр. лит., 1960. С. 319–374.
- Фабри К. Основы зоопсихологии. М.: Изд-во МГУ, 1993.
- Шепард Г. Нейробиология. М.: Мир, 1987. Т. 1–2.
- Development and neurobiology of *Drosophila* / Ed. O. Siddiqi et al. N.Y.; L.: Plenum press, 1979.
- Neurosciences // Science. 1996. Vol. 274. Nov. 15.

ГЕНЫ И ПОВЕДЕНИЕ

Глава 6

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Родоначальником генетики поведения можно считать величайшего мыслителя IV в. Аврелия Августина. На досуге он разводил рыбок в аквариуме и наблюдал за их поведением, в частности за тем, как они берут корм, и обратил внимание на то, что особенности поведения в точности передаются от родителей потомкам. Этот вывод, в сущности, составляет основание генетики поведения. Однако как самостоятельный раздел науки она возникла только после того, как Т.Г. Морган в 20–30-е годы сформулировал основные положения хромосомной теории наследственности и понятие гена прочно вошло в биологическую науку.

Тогда же произошло и первое столкновение генетиков и физиологов, изучавших поведение животных. Русский физиолог И.П. Павлов выступил на Международном физиологическом конгрессе и рассказал, что будто бы его сотруднику удалось в экспериментах на мышах преобразовать условный рефлекс в безусловный. У первого поколения мышей, с которыми он работал, условный рефлекс вырабатывался медленно, у их потомства быстрее, у следующего поколения – еще быстрее и так далее, пока в конце концов условный рефлекс не превратился в безусловный. Доклад Павлова слушал Морган, и он, естественно, усомнился в достоверности представленных автором данных, поскольку они противоречили одному из основных положений генетики, доказавшей, что наследование приобретенных признаков невозможно. Он сообщил об этом другому русскому ученому Н.К. Кольцову, и тот предположил, что скорее всего не мыши учились лучше, а сотрудник Павлова тренировался по ходу проведения эксперимента, пока не усовершенствовался настолько, что мог очень быстро обучать животных нужному навыку. Так оно и оказалось, и И.П. Павлов уволил незадачливого ученого.

Н.К. Кольцов не случайно заинтересовался работами лаборатории И.П. Павлова. Дело в том, что в его институте изучались генетические основы психических особенностей крыс. Одним из главных результатов исследования было то, что в пределах одного и того же вида разные особи обнаруживают разные способности. Отсюда возникла задача подвергнуть психические способности генетическому анализу, выделить среди крыс различные наследственные типы психических способностей, очистить их путем отбора в течение ряда поколений и перейти к установлению менделевских законов наследования. Первое система-

тическое исследование в этом направлении было выполнено в 1913 г. А. Йерксом (Jerks), который описал наследование комплекса злобности, пугливости и дикости у крыс, а в 1916 г. Бэгг (Bagg) предпринял попытку выяснить характер наследования способности к обучению в лабиринте у пяти линий мышей и их потомков. Несмотря на большую вариабельность по способности к обучению были установлены достоверные межлинейные различия по этому признаку. В дальнейшем оказалось, что и разные породы крыс обучаются с различной скоростью, был обнаружен полиморфизм по признаку быстрого и медленного обучения в лабиринте в популяции лабораторных животных.

Российский психолог В.Н. Дружинин, опираясь на результаты исследования одно- и разнояйцевых близнецов, показал, что уровень общего интеллекта зависит в большей мере от генотипа, чем от среды и генно-средового взаимодействия. Так, корреляция уровней интеллектов однойцевых близнецов колеблется от 0,7 до 0,95 в зависимости от методики проведения исследования и т.д. В то же время стиль семейного воспитания, эмоциональной поддержки, контроля за поведением влияет на уровень и структуру общего интеллекта. Наиболее благоприятны для его развития и проявления эмоциональная поддержка в сочетании с умеренным контролем за поведением детей и заботой о ребенке. В тех семьях, где осуществляется жесткий контроль в сочетании с пренебрежением потребностями ребенка и отсутствием эмоциональной поддержки наблюдается задержка интеллектуального развития детей.

Исторически сложилось три главных подхода в изучении генетики поведения.

Первый заключается в определении поведенческих различий между различными линиями того же самого вида или между тесно родственными видами. Так, были обнаружены выраженные индивидуальные различия в обучении избеганию ударов электрическим током в гетерогенной популяции мышей Swiss-Webster. Сравнение индивидуальных кривых обучения показывает, что каждый индивидум имеет свой определенный уровень выполнения задачи. В прошедших инбридинг линиях эти различия сглаживаются, но появляются значительные межлинейные различия (рис. 6.1). Мыши линий C57BL и C3H предпочитают пить воду с добавлением спирта, в то время как мыши линий BALB/c и A/3 демонстрируют отвращение к спирту. Было обнаружено также, что некоторые дети имеют склонность к употреблению спирта, по-видимому, генетически детерминированную.

Об этом свидетельствуют, в частности, исследования на близнецах, которые показали, что различия между индивидуальными генотипами вносят определенный вклад в вариабельность по некоторым характеристикам потребления алкоголя: полное воздержание, употребление в больших количествах и с большей частотой. Вариабельность подверженности алкоголизму как болезни во многом определяется генетическими факторами. Роль наследственного предрасположения в возникновении алкоголизма подтверждается: 1) повышением вероятности возникновения алкоголизма у лиц с наследственным предрасположением

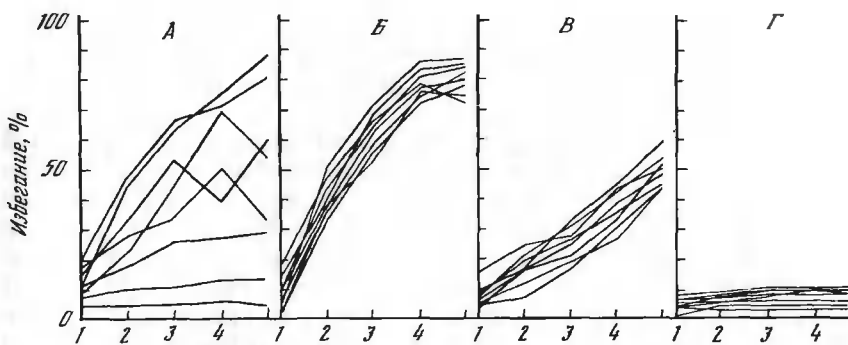


Рис. 6.1. Обучение избеганию в гетерогенной популяции мышей (А), в линиях Swiss (Б), DBA/2J (В) и СВА(Г). По Bovet et al., 1969. Каждая кривая представляет собой поведение отдельной мыши в течение 5 опытов избегания из 100 проб каждый.

независимо от условий воспитания, 2) отсутствием различий в частоте алкоголизма у полусибсов, имеющих биологического родителя, больного алкоголизмом, независимо от наличия алкоголизма у воспитателя. 3) достоверно большей корреляцией частоты развития алкоголизма с характером наследственного предрасположения, чем с характером воспитания.

Крысы линии Эриксона, различавшиеся по высокой и низкой степени алкогольного предпочтения, подвергались многочисленным исследованиям для выяснения физиологических межлинейных различий. Они не обнаружили различий по суточному ритму алкогольного потребления, но в крови у крыс линии с высоким алкогольным предпочтением наблюдались более высокие, явно токсические уровни алкоголя. Скорость удаления алкоголя из крови после введения некоторой его дозы была сходной у обеих линий, а уровень содержания ацетальдегида был выше у линии с низким предпочтением. Отношение уровней бета-гидроксibuтирата и ацетоацетата в печени было достоверно выше во время алкогольного метаболизма у крыс линии с высоким алкогольным предпочтением. Это указывает на различия в состоянии внутримитохондриальной редокс-цепи клеток печени во время метаболизма алкоголя. Таким образом, существуют некоторые межлинейные различия для альдегидного метаболизма и возможно, что более медленное удаление альдегидов могло быть причиной влияния альдегидов на центральную нервную систему. Это, вероятно, и ограничивало потребление алкоголя у линии крыс с низким его предпочтением. Были обнаружены также некоторые нейрохимические различия между линиями крыс Эриксона, селективированных на низкое и высокое алкогольное потребление. Оказалось, что более высокие концентрации 5-гидрокситриптамина и 5-гидроксииндолилуксусной кислоты (5-ГИУК) в мозгу присущи крысам с высоким алкогольным потреблением. Различия в уровне 5-ГИУК увеличивались при блокировании удаления 5-ГИУК пробенци-

дом. Была установлена еще одна нейрохимическая особенность: увеличение числа ионов калия после электрической стимуляции срезов коры больших полушарий угнеталось при потреблении алкоголя крысами с низким его предпочтением.

Генетически детерминированная изменчивость поведения отражает соответствующую изменчивость как морфологических, так и молекулярных признаков нервной системы. Так, были зарегистрированы различия в генетической изменчивости числа нейронов *regio inferior* аммонова рога и зубчатой фасции гиппокампа между инбредными линиями мышей. Обнаружились значительные различия в анализируемых признаках – объемах структур, вычисленных по стандартным морфометрическим методикам; 85% общей изменчивости числа клеток зубчатой фасции определяются аддитивными факторами. Размеры площади различных частей гиппокампа, как уже упоминалось, тесно связанного с осуществлением поведенческих актов, (*stratum pyramidale*, *regio inferior*, зон проекций мшистых волокон на базальных дендритах пирамидных клеток поля CA4, зоны окончаний волокон из энторинальной зоны на апикальных дендритах) определяются полигенными системами, т.е. требуют включения целого каскада генов.

Интересны данные о межлинейных различиях в количестве нервных клеток зубчатой фасции гиппокампа. Так, мыши линии C58/J обладают наибольшим числом клеток, а мыши линии LG/J – наименьшим. Генетический анализ (получение рецiproкных гибридов между этими линиями и этих линий с другими, промежуточными по значению изучаемого признака) показал, что количество нейронов гранулярного слоя зубчатой фасции определяется аутосомными генами с аддитивным эффектом. Генетически детерминированные вариации в размерах и количестве нервных элементов гиппокампа коррелируют с особенностями выработки у мышей реакции пассивного избегания. Она заключается в том, что животное, стремясь избежать удара электрическим током, отыскивает безопасное место (обычно полочка на стенке экспериментальной камеры или специально смонтированная платформа). Повторные удары тока формируют реакцию избегания. Тестирование прочности выработанного навыка выражается в оценке времени, в течение которого животное остается в безопасном месте. Опыты с группой мышей-гибридов F₂ от скрещивания особей двух инбредных линий, различающихся по размерам гиппокампа, обнаружили значительные вариации в их способности к обучению реакции избегания. Последующее определение размеров гиппокампа показало, что вариации в обучаемости достоверно коррелируют с изменчивостью массы этой структуры: чем больше размер гиппокампа, тем лучше закрепляется приобретенный навык. Полученные данные подтверждают гипотезу о важной роли гиппокампа в определении степени новизны обстановки и в формировании им сигналов к началу действия.

Число дофаминэргических нейронов в черной субстанции и в стриатуме у мышей, гомозиготных по неврологической мутации *wv*, достоверно ниже, чем у фенотипически близких к норме гетерозигот *wv/+* и у нормальных мышей. Грубые нарушения двигательной сферы и пове-

дения у этих мышей могут иметь основанием не только нарушения в гистогенезе мозжечка, но и аномалии нигростриального комплекса. После имплантации в область базальных ганглиев эмбриональной ткани черной субстанции, взятой от доноров с нормальным генотипом неврологические симптомы мутации частично компенсируются.

Оказалось, что межлинейные различия в уровне активности тирозингидроксилазы – ключевого фермента синтеза катехоламинов у мышей линий CBA/J и BALB/cJ коррелируют с разным числом дофаминэргических нейронов черной субстанции среднего мозга, а также с рядом показателей поведения и способностью к обучению. С помощью морфометрических методов было обнаружено, что у линии CBA в области ствола таких нейронов на 50% меньше, чем у C57BL. В то же время количество фермента, приходящееся на один нейрон, было одинаковым у обеих линий. Интересно, что меньшее число дофаминэргических нейронов у животных линии CBA коррелировало с меньшим объемом структур стриатум по сравнению с линией C57BL, что при неизменной плотности нервных элементов является косвенным свидетельством меньшего числа нейронов этой структуры. Недавно выявлен генетический контроль числа дофаминовых рецепторов D₂ в хвостатом ядре мыши в корреляции с разной реактивностью к фармакологическим агентам. Обнаруженные межлинейные различия в числе дофаминэргических нейронов захватывают все эту медиаторную систему, поскольку аналогичные различия были найдены также в преоптической области и медиобазальном, медиальном и дорзальном гипоталамусе. В то же время численность норадренэргических нейронов locus coeruleus у линий CBA и BALB не различалась. При сравнении другой пары линий – C57BL/6J и BALB/c – обнаружено, что у BALB на 38% меньше клеток locus coeruleus, содержащих катехоламины. У мышей линии C57BL выявлено большее число норадренэргических окончаний в новой коре, гиппокампе и коре мозжечка. У мышей линий C57BL/6J и C57BL/2J, различающихся по способности к обучению и поведению в открытом поле были обнаружены различия в 20–32% в плотности ацетилхолинэргических нейронов ряда структур переднего мозга. У крыс с генетически детерминированной гипертензией повышено по сравнению с нормальными животными число адренэргических нейронов. Следовательно, в данном случае изменения уровня активности фермента, отражающиеся на поведении животного, были связаны не с мутацией соответствующего структурного или регуляторного гена и молекулярными изменениями в определенном данном наборе нервных клеток, но с системой генов, контролирующей количество клеток, характеризующихся именно этой эргичностью при в общем неизменном уровне активности фермента в каждой клетке. Бэкер (Baker) предположил, что вариации в количестве нейронов определенного нейрохимического класса есть общий механизм, лежащий в основе генетических различий в содержании медиаторов. Мы имеем, следовательно, пример **многоуровневой генетической регуляции**, о которой уже упоминалось.

Это подтверждается и данными о межлинейных различиях в содержании различных медиаторных рецепторов. Так, у спонтанно-спа-

стичных мышей (рецессивная мутация в 3-й хромосоме, ведущая к 3-й неделе жизни к развитию тремора и гипервозбудимости) обнаружено снижение концентрации мест связывания стрихнина (глициновых рецепторов) во всех районах мозга на 20–30%. Сходные поведенческие отклонения наблюдаются при введении субсудорожных доз стрихнина (антагониста глицина) нормальным животным. Вместе с тем другие параметры глициновых рецепторов у спастических мышей не отличались от контроля. Следовательно, структурные гены субъединиц рецептора не изменены, и мутация затрагивает ген-регулятор экспрессии структурных генов рецептора. Следует отметить, что вообще во многих других случаях межлинейные различия в концентрации нейрональных рецепторов являются **вторичными по отношению к иным нейрохимическим дефектам**.

Подобного рода межличностные различия могут характеризоваться и региональной специфичностью. Например, линии крыс Fischer 344 и Buffalo различаются по ряду ответных поведенческих реакций и в частности по реакциям, связанным со стрессом. При этом у крыс линии Buffalo концентрация альфа-1- и альфа-2-адренорецепторов в продолговатом мозге в 3 раза выше. Обнаружены также межлинейные различия в концентрации дофаминовых рецепторов. Однако дальнейшее изучение обеих линий позволило установить, что у крыс линии Buffalo активность фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы – фермента, превращающего норадреналин в адреналин, в продолговатом мозге в 5 раз меньше, чем у крыс линии Fischer 344. В то же время в коре головного мозга, где данный фермент, а значит, и адреналин не выявлены, содержание альфа-адренорецепторов у крыс обеих линий не различалось.

Вариации в функционировании генов, контролирующих формирование нейтральных ядер в определенной эргичности, могут лежать в основе развития некоторых заболеваний, существенно нарушающих поведенческие реакции. Так, при болезни Паркинсона, проявляющейся в дрожании (треморе) конечностей и осложняющей тем самым жизнь пациента, резко падает содержание дофамина в базальных ганглиях мозга. Выявление генетически детерминированных различий в числе дофаминэргических нейронов нигростриатальной системы привело к предположению, что паркинсонизм является следствием дефицита дофамина, обусловленного недостаточностью в количестве нейронов, синтезирующих этот медиатор. Иными словами, проявление нарушений в двигательной сфере имеет место в данном случае тогда, когда число дофаминэргических нейронов делается ниже некоторой критической величины.

Внутри линий наблюдается поведенческая однородность, что следует из анализа поведения (активное избегание) двух инбредных линий мышей, испытанных в челночной камере, где животное должно забегать из одного отделения клетки с двойным сетчатым дном в другое для того, чтобы избежать удара током при предъявлении светового или звукового раздражителя. В то же время генетические различия, присущие отдельным инбредным линиям мышей, проявляются в четких поведенческих различиях по уровню избегания (см. рис. 6.1). При сравнении

общих уровней поведения у девяти линий мышей видно, что 3 линии проявили низкий уровень избегания (C57BL/6J, C3H/HeJ, CBA), две (DBA/2J, C57BR/cdJ) достигли очень высокого уровня избегания, в то время как у остальных линий были промежуточные значения изучаемого показателя. Эти различия были достоверно значимыми и при использовании звукового, а не светового условного раздражителя, хотя межлинейный размах варьирования снизился, поскольку применение тона или зуммера у грызунов может являться само по себе отрицательным безусловным раздражителем, снижающим проявление возможного поведенческого разнообразия.

Межлинейные различия, выявленные при выполнении основного задания, сохранялись и в более сложной ситуации, когда требовалась переделка условной реакции в ответ на световой стимул – в реакцию на звуковой стимул или наоборот. Мыши, первоначально обученные реагировать на световой (или звуковой) условный раздражитель, в челночной камере обнаруживали очень низкий уровень избегания при применении звукового (или светового) раздражителя. Напротив, высокие уровни переделки поведения наблюдались в тех случаях, когда мыши предварительно подвергались небольшим сериям испытаний, в которых применялся сложный условный раздражитель, составленный из комбинации известных и нового стимулов, или когда применялись стимулы с одной и той же частотой повторения (вспышки света или пульсация звука). Используя эту экспериментальную модель, удалось показать, что ранее обнаруженные межлинейные различия проявлялись и здесь, а степень переделки условного рефлекса, не зависящая от уровня тренировки, определялась генетическими особенностями каждой изученной линии.

У мышей различных линий отмечен выраженный полиморфизм по степени агрессивности на насекомых. Выявлены существенные межлинейные различия как по проценту мышей, нападающих на саранчу, так и по латентному времени реакции. Между этими показателями обнаружена отрицательная межлинейная корреляция, т.е. чем меньше латентное время нападения на жертву, тем больше процент агрессивных животных в линии. Это неудивительно, поскольку данные величины функционально связаны (неагрессивными будут животные с большим латентным временем). Закономерности наследования агрессии хищника у мышей изучались в тесте убийства саранчовых с помощью диаллельного (когда попарно скрещивается каждая линия с каждой, а затем результаты обрабатываются специальными математическими методами) и менделевского анализа. Диаллельный анализ был проведен на трех линиях мышей: BALB/c, DD и C57BL/6 и включал родительские линии и их всевозможные реципрокные гибриды первого поколения (рис. 6.2).

Результаты анализа указывают на значительный вклад специфической комбинационной способности в генотипическое разнообразие как по величине латентного периода, так и по доле агрессивных животных. Вклады общей комбинационной способности и реципрокных эффектов и разнообразие по данным признакам незначительны. Это свидетельствует о том, что при наследовании этих признаков существенную роль

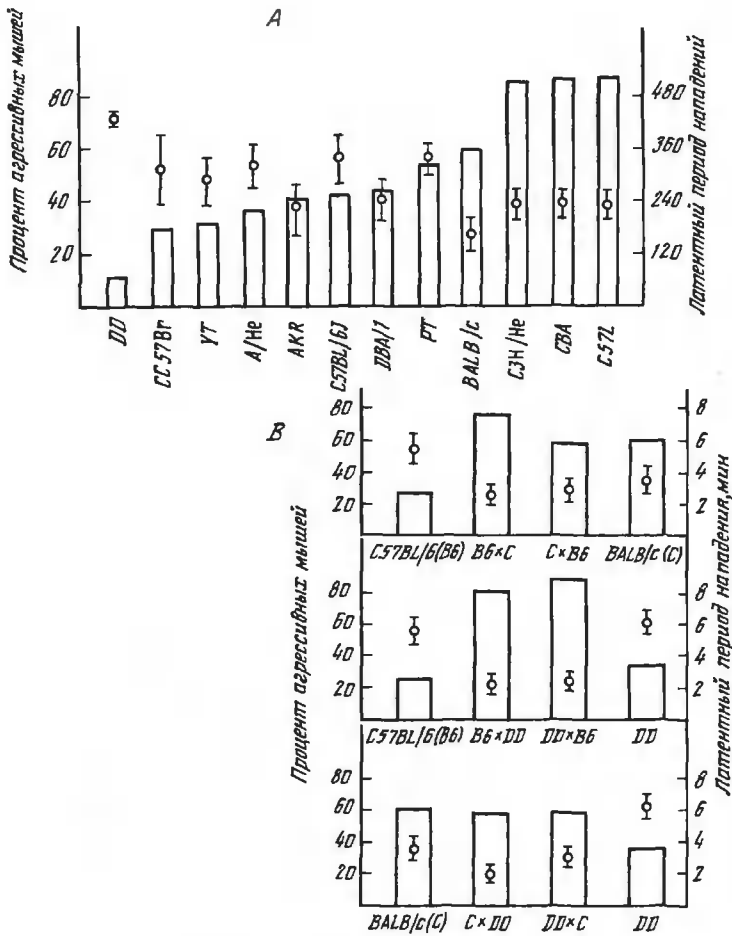


Рис. 6.2. Генетика агрессивности у мышей.

А – межлинейные различия в агрессивности хищника у мышей. Столбики – процент агрессивных мышей каждой линии, кружочки с разбросом – латентный период реакции нападения. По Никулиной, 1981.

В – агрессивность хищника у мышей инбредных линий и их гибридов F_1 . Столбики – доля агрессивных мышей, кружочки с разбросом – латентный период нападения. По Никулиной, Поповой, 1983.

играют только неаддитивные эффекты (доминирование и гетерозис), отсутствуют сцепление с полом и материнский эффект. Можно также говорить о небольшом числе генов, контролирующих данный признак.

Выявлены межлинейные различия в межсамцовой агрессивности у мышей при их содержании в группах по 2–8 самцов, и исследованы интерактивность (число драк и суммарное время драк) и уровень (процент агрессивных животных) спонтанной агрессии у мышей семи инбредных

линий. Оказалось, что имеется высокая положительная межлинейная корреляция между двумя показателями интенсивной агрессивной реакции. Наивысшая интенсивность этой формы поведения отмечена у мышей линии C57BL/6, а наименьшая – у DBA/1. Значительные межлинейные различия по суммарному уровню драк и по числу нападений свидетельствуют о существенном вкладе генотипа в фенотипическое разнообразие по данным показателям. Существенный вклад генотипа был показан также для уровня спонтанной агрессии, выраженного долей агрессивных животных в линии. Уровень агрессивности не коррелировал с ее интенсивностью, оцененной как по времени драк, так и по числу нападений. Вероятно, интенсивность и уровень агрессивности характеризуют разные стороны поведения и регулируются различными генетическими механизмами, которые регулируют созревание в онтогенезе различных нейронных модулей. Уровень агрессивности характеризует порог агрессивной реакции, “вспыльчивость” мышей данной линии, в то время как интенсивность – выраженность уже возникшего агрессивного поведения.

Иные закономерности обнаружены при наследовании уровня спонтанной агрессивности, отражающего величину порога агрессивной реакции. При скрещивании мышей высокоагрессивной линии C57BL/6 с животными низкоагрессивной линии BALB/c было установлено наследование высокого уровня агрессивности у гибридов первого поколения. У гибридов второго поколения и беккроссов (особей, полученных при обратном скрещивании) на низкоагрессивного родителя – BALB/c – отмечен более низкий процент агрессивных животных, чем у гибридов первого поколения. Очевидно, снижение уровня агрессивности у генетически гетерогенных гибридов второго поколения и беккроссов обусловлено тем, что вследствие расщепления по генам, контролирующим признак, среди гибридов появились животные с генетически детерминированным низким уровнем агрессивности. Вообще же доминирование высокого уровня агрессивности не является характерной особенностью только этих двух линий. Такой тип доминирования был отмечен также и при скрещивании других линий мышей.

Известно, что агрессивное поведение в популяции мышей играет существенную роль в установлении иерархической структуры. Показано, что у мышей агрессивной линии иерархические отношения формируются, в то время как у животных неагрессивной линии – нет. Однако при слишком высокой интенсивности драк резко возрастает смертность животных. В связи с этим оптимальным для популяции будет поддержание интенсивности агрессии, которое стабилизирует значение признака в популяции на среднем уровне, что является благоприятным для популяции мышей.

Следует отметить, что агрессия хищника и межсамцовая агрессия мышей контролируются **разными генетическими системами**, поскольку отсутствует корреляция между числом мышей, нападающих на саранчовых, и долей особей, проявляющих межсамцовую агрессию, а также между выраженностью агрессии хищника и общим временем драк. Активность этих генетических систем проявляется

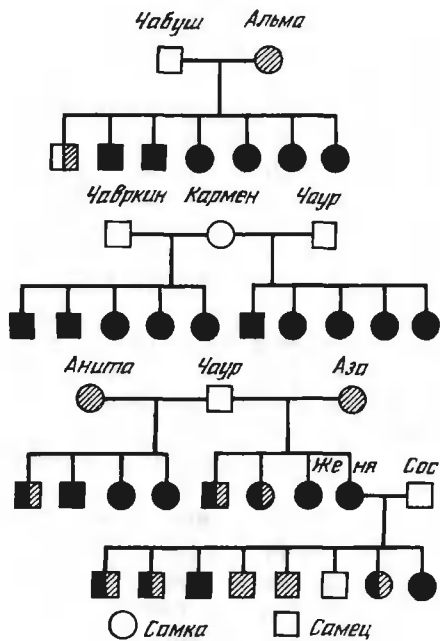


Рис. 6.3. Проявление пассивно-оборонительной реакции при скрещивании немецких овчарок (Альма, Кармен, Анита, Аза) с гиляцкими лайками (Чабуш, Чаур, Чавркин) и произошедшее расщепление при скрещивании с возбужденной и нетрусливой собакой (Сос).

Черным обозначено наличие трусости, штрихом – агрессивность, не заштриховано отсутствие трусости и агрессивности. По Крушинскому, 1938.

по-разному в тех нейтральных модулях, которые ответственны за соответствующий тип поведенческой реакции.

При нейрохимическом исследовании мышей-альбиносов агрессивной и неагрессивной линий было установлено, что у животных агрессивной линии наблюдается более высокое содержание

норадреналина (НА) в мозговом стволе и более низкие концентрации 5-гидрокситриптамина в переднем мозге по сравнению с животными неагрессивной линии.

Российский генетик Л.В. Крушинский нашел, что пассивно- и активно-оборонительные реакции у собак наследуются независимо. Если они проявляются у одной и той же особи, то формируется злобно-трусливое поведение. При этом один из компонентов может подавлять проявление другого, что было продемонстрировано с помощью гибридологического анализа с параллельным использованием фармакологических препаратов, которые изменяют степень выраженности отдельных компонентов оборонительного комплекса “злобно-трусливых” собак. Оказалось, что проявление оборонительных реакций находится в большой зависимости от степени общей возбудимости животного, так что генетически обусловленные реакции могут не проявиться в фенотипе животного при малой его возбудимости. Однако потомство, полученное при скрещивании таких животных с возбудимыми особями, проявляет ясно выраженное оборонительное поведение. Повышенная возбудимость собак наследуется как доминантный или неполностью доминантный признак. Зависимость проявления трусливого поведения у собак от разной степени возбудимости была показана на примере скрещивания немецких овчарок с гиляцкими лайками. Маловозбудимые нетрусливые гиляцкие лайки скрещивались с возбудимыми нетрусливыми немецкими овчарками. Все потомки этого скрещивания обладали повышенной возбудимостью и выраженной трусостью (рис. 6.3). В этом скрещивании генотипически пассивно-оборонительная позиция унаследована от

гиляцких лаек, у которых она не проявлялась из-за недостаточно высокой возбудимости их нервной системы. Изменяя состояние возбудимости нервной системы (например, с помощью фармакологических препаратов), можно изменять и выражение оборонительной реакции поведения. Следовательно, данный поведенческий признак формируется на основе взаимодействия целого ряда генов.

У собак отмечены также значительные межпородные различия по наследованию реакции лая. Наибольшие различия выявлены между коккер-спаниелями, которые лают очень часто, и бейсенджи (африканские охотничьи собаки), которые почти не лают. Гибриды первого поколения (F_1) по своей реакции лая близки к спаниелям. Это указывает на доминантный характер наследования данного свойства. При этом характер расщепления гибридов показал, что найденные различия легче всего объяснить наличием одного доминантного гена, обуславливающего низкий порок реакции лая на внешние раздражители. Однако помимо наследования гена на формирование данного признака поведения оказывает, как и в предыдущем случае, влияние большое количество генов-модификаторов. Иными словами, наследуется вариабельность в проявлении реакции лая. Однако каждая порода собак характеризуется определенными границами этой вариабельности, которые детерминируются взаимодействием генов. В пределах этой вариабельности, обозначаемых обычно как **норма реакции**, возможна колеблемость признака, которая может зависеть как от внутренних, так и (в меньшей степени) от внешних обстоятельств, например от температуры (известны различные гено-контролирующие признаки, в том числе и связанные с поведением, проявляющиеся только при определенных температурных условиях).

От взаимодействия генов зависят такие особенности проявления их действия, как **пенетрантность** (доля особей, обладающих данным признаком), **экспрессивность** (степень выраженности признака) и **специфичность** или **поле действия** (особенности фенотипического проявления).

Второй подход к анализу наследования поведенческих признаков – селекция животных на определенный вид поведения из аутбредной популяции. Первые эксперименты такого рода были предприняты Толмэном (Tolman) в 1924 г. Он обнаружил среди белых крыс полиморфизм по способности к обучению в Т-образном лабиринте (рис. 6.4). Была измерена способность учиться получать пищу в конце multiple T-maze путем подсчета количества проб и ошибок. Чтобы добраться до конца лабиринта и получить пищу, крысе приходится пройти и через несколько тупиковых отделов лабиринта. Чем крыса “умнее”, тем быстрее она обучается избегать эти тупиковые пути. Если скрещивать “умных” мышей с “умными”, а “глупых” с “глупыми”, то можно отселектировать линии “умных” и “глупых” животных, что особенно четко было продемонстрировано Р. Трайном (Труон) в 1942 г., проводившим такую селекцию на протяжении 18 поколений.

Российские генетики выявили полиморфизм по скорости выработки пищедобывательного двигательного условного рефлекса в по-



Рис. 6.4. Множественный Т-лабиринт, используемый для обучения крыс.

пуляции лабораторных крыс. Крысы должны были в ответ на световой (вспышка лампочки) или звуковой (звонок) сигнал прыгнуть на определенную площадку в клетке, после чего они получали пищевое подкрепление. Средний показатель скорости выработки условного рефлекса в популяции из 60 лабораторных крыс равен 22,8 сочетаний и колеблется от 3

сочетаний до 93. Налицо, таким образом, значительная индивидуальная вариабельность животных по их способности к обучению.

Из исследованной популяции крыс были отселекционированы две линии, отличающиеся по скорости выработки условного двигательного пищедобывательного рефлекса (рис. 6.5). Анализ этих животных показал, что распределение по данному признаку практически не отличается от нормального, что позволило вычислить показатель наследуемости признака. Он оказался достаточно высок и равен 0,34. Селекция на лучшую способность к обучению повлекла за собой увеличение массы мозга и особенно гиппокампа, о роли которого в процессе обучения хорошо известно. Гранулярные нейроны зубчатой фасции гиппокампа имеют прямое отношение к хранению следов прошлого опыта. В генетически гетерогенной популяции мышей была обнаружена корреляция между размерами гиппокампа и способностью к формированию условной избегательной реакции.

Селекция на высокий вес мозга увеличивает темпы эмбрионального и неонатального роста, но не изменяет его продолжительность. Животные этих линий имеют более тяжелый мозг при рождении по сравнению с неселекционированным контролем, и эта разница сохраняется в течение всего периода постнатального роста. Селекция в обратном направлении не изменяет темпы эмбрионального развития нервной ткани. Масса мозга у новорожденных селекционированных животных одинакова с массой мозга неселекционированного контроля. Однако у первых наблюдается более ранняя остановка в постнатальном развитии мозга. Это может иметь существенные последствия для поведения, поскольку вместе с сокращением периода морфогенеза мозга изменяется продолжительность периода, зависящего от средовой стимуляции становления нервной системы в пределах нормы реакции. Установлено, что средовые воздействия в ранний период онтогенеза влияют на некоторые морфологические параметры нервной ткани. Так, увеличение числа микронейронов (звездчатых, ретикулярных и гранулярных нерв-

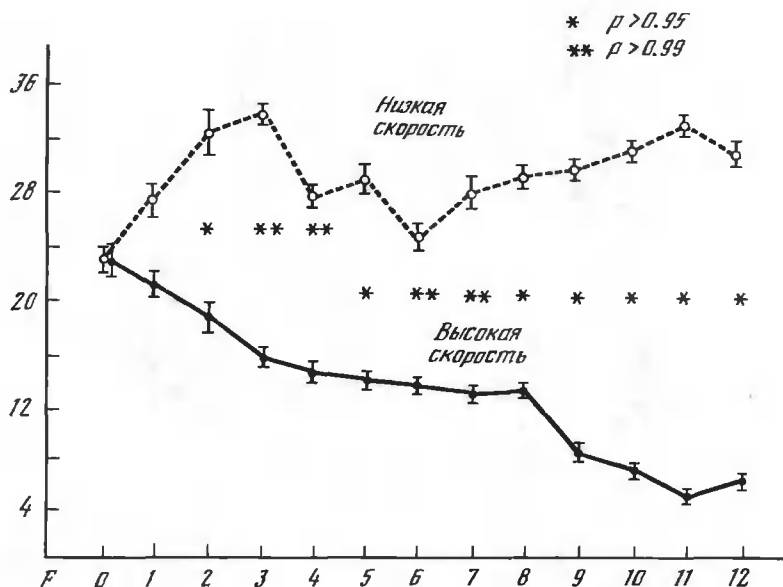


Рис. 6.5. Скорость формирования трехчленного условного пищедобывательного рефлекса у “умных” и “глупых” крыс. По Корочкину и Шумской.

ных клеток), которым приписывается особо важная роль в осуществлении творческой функции мозга, происходит и после рождения. Средовые воздействия в ранний постнатальный критический период развития ведут к увеличению числа микронейронов и, что особенно важно, к усложнению их дендритных связей. Вследствие этого селекция на более низкую массу мозга, сокращая период его постнатального развития, может уменьшать как число нейронов, так и сложность межнейронных контактов.

С помощью селекции были выведены линии животных, различающихся по эмоциональности. Такая работа была проведена П. Бродхерстом (Broadhurst), избравшим в качестве исходной популяции белых крыс линии Вистар с неопределенным генетическим фоном, которая в силу этого обеспечила максимум генетической изменчивости, необходимый на начальных этапах селекции. В течение 15 последовательных поколений вся популяция (3673 крысы) испытывалась в тесте “открытого поля” (рис. 6.6).

Высокий и низкий уровни эмоциональности определяли по высокому и низкому уровню дефекации. Результаты отбора на низкий и высокий уровень дефекации представлены на рис. 6.7. То, что генетически детерминированная дивергенция на две линии осуществляется медленно, свидетельствует о полигенном наследовании данного признака. В то же время следует отметить, что отбор по одному признаку, особенно если последний определяется многими генами, часто приводит к измене-

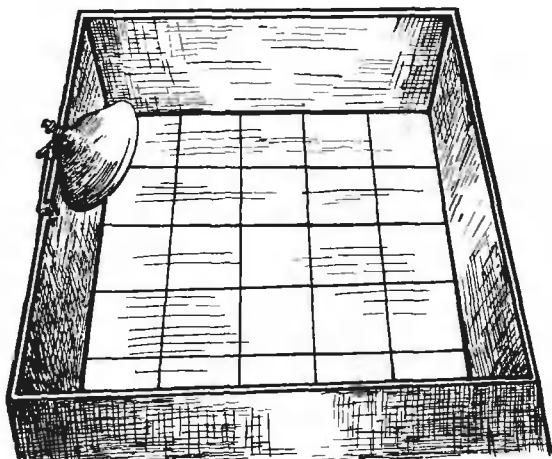


Рис. 6.6. Тест-система “Открытое поле”.

нию и других признаков, в частности. нарастание межлинейных различий по уровню дефекации сопровождалось появлением различий по двигательной активности. Кроме того, линия с высоким уровнем дефекации (реактивная – Р) оказалась более способной к выработке условного эмоционального рефлекса. Этот рефлекс заключался в том, что при подаче условного сигнала, который сочетался с болевым электрическим раздражением, происходит торможение другого условного рефлекса: число нажатий на рычаг аппарата Скиннера уменьшается (каж-

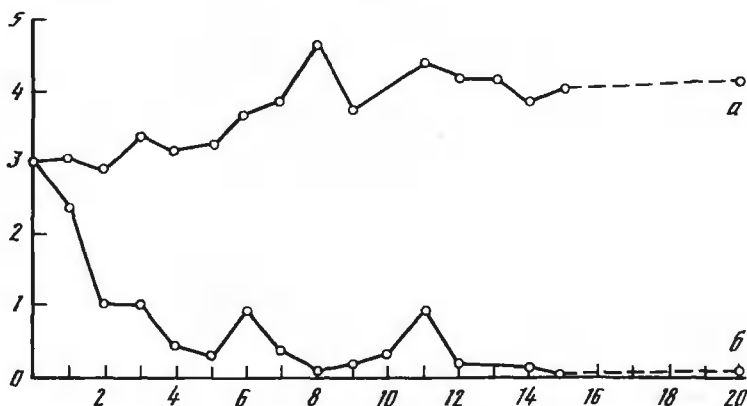


Рис. 6.7. Селекция на высокую и низкую эмоциональность у крыс реактивной (а) и нерективной (б) линий Модсли.

По оси абсцисс – поколения селекции, по оси ординат – среднее число фекальных шариков за опыт. Прерывистая линия – с 15-го по 20-е поколение селекция не проводилась

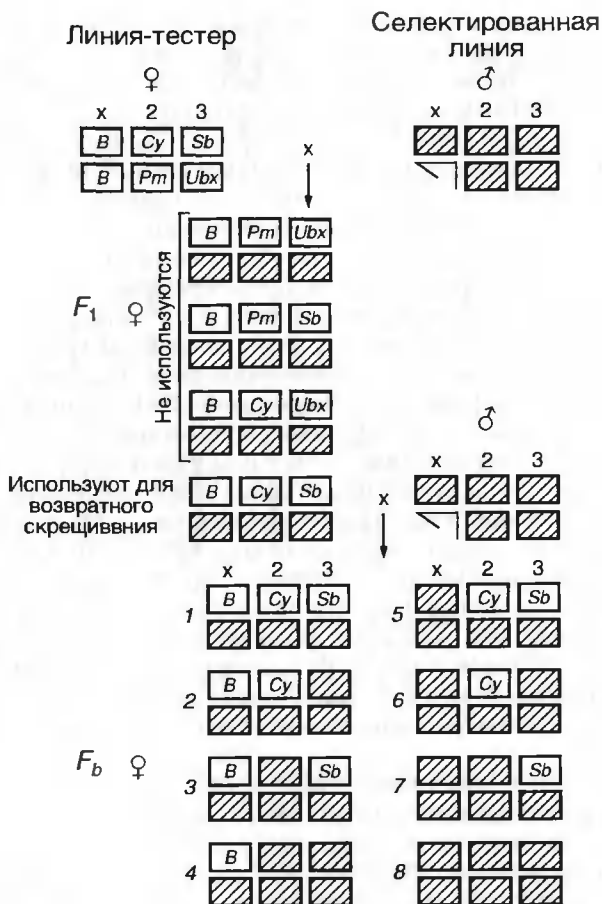


Рис. 6.8. Схема скрещивания для определения влияния на геотаксис дрозофилы рецессивных аллелей трех крупных хромосом. По Hirsch, Erlenmeyer-Kimling, 1962).

Хромосомы из линии-тестера обозначены белыми прямоугольниками, из анализируемой линии – заштрихованными.

дое нажатие всегда подкреплялось водой). Это и понятно, если учесть множество нервных модулей, задействованных в этих поведенческих реакциях и сложность взаимодействий между этими модулями. У двух отселектированных таким образом линий были также обнаружены физиологические различия. Крысы линии Р имеют большие по размерам щитовидную железу и надпочечники и проявляют много признаков, свидетельствующих о постоянной предрасположенности эндокринной системы к стрессу.

При отборе по поведению чаще всего практикуют селекцию в течение 20–30 поколений, хотя иногда отбор проводится в течение

100–300 поколений. Существуют специальные методы локализации генов, ответственных за различия по поведению в отселектированных линиях. В качестве примера можно провести селекцию дрозофилы на линии с положительным и отрицательным геотаксисом.

Для того чтобы выявить роль каждой из крупных хромосом в контролировании поведенческих реакций контрастных линий, были испытаны гибридные особи F_2 (backcross) от скрещивания селектированных линий, а также исходной популяции, с тестерной линией, поведение которой было принято за контрольное, была взята линия $S^{SI} B InS w^{a}; Sc^8; SMI Cy/Pm; Ubx/Sb$. В результате системы скрещиваний, представленной на рис. 6.8, при возвратном скрещивании на анализируемую линию получают 8 кариотипов, у которых каждая из крупных хромосом либо гомозиготна по генам анализируемой линии, либо гетерозиготна, т.е. находится в паре с маркированной хромосомой из линии-тестера. Были сопоставлены эффекты трех крупных хромосом в трех линиях. Оказалось, что в исходной популяции гены хромосом X и 2 способствуют положительному геотаксису, а гены хромосомы 3 – отрицательному. Отбор на положительный геотаксис затрагивает в основном лишь последнюю хромосому, меняя ее эффект на положительный. Отбор на отрицательный геотаксис меняет генетическое содержание всех трех хромосом, причем позитивные эффекты хромосом X и 2 сильно снижаются, становясь почти нейтральными, влияние же хромосомы 3 на отрицательный геотаксис усиливается. Видна, следовательно, сложная обусловленность поведения мух в геотактическом лабиринте и неальтернативная природа генетических сдвигов при отборе в альтернативных направлениях.

Третий подход, особенно активно применяемый в наши дни, связан с изучением эффектов отдельных генов на поведение. Известно множество примеров такого рода эффектов у самых разных животных. Типичным случаем является процесс очистки пчелами сот от личинок, погибших от распространенной болезни – американской пчелиной гнильцы, переносимой *Bacillus larvae*. Обнаружены гигиенические и негигиенические пчелы. Первые распечатывают ячейки, в которых находятся зараженные болезнью личинки, и немедленно их оттуда выбрасывают. В противном случае трупы личинок с содержащимися в них спорами переносчика болезни способствуют постоянному распространению инфекции. Гигиеническое поведение пчел осуществляется в два этапа, каждый из которых контролируется одним геном: 1) распечатка сотовых ячеек (рецессивный ген *u*), 2) удаление содержимого ячеек (рецессивный ген *r*). Следовательно, генотип пчел в гигиеническом улье может быть записан как *uwr*.

В настоящее время широко используется тот факт, что внутри инбредной линии с относительно постоянным генотипом появляются спонтанные мутанты с изменениями тех или иных поведенческих реакций. Особенно активные исследования в этом направлении начались в 60-е годы с работ Сеймура Бензера (Benzer). Идея Бензера заключалась в том, чтобы для получения поведенческих мутантов дрозофилы создавать аналоги селективных сред, где в качестве селектирующего факто-

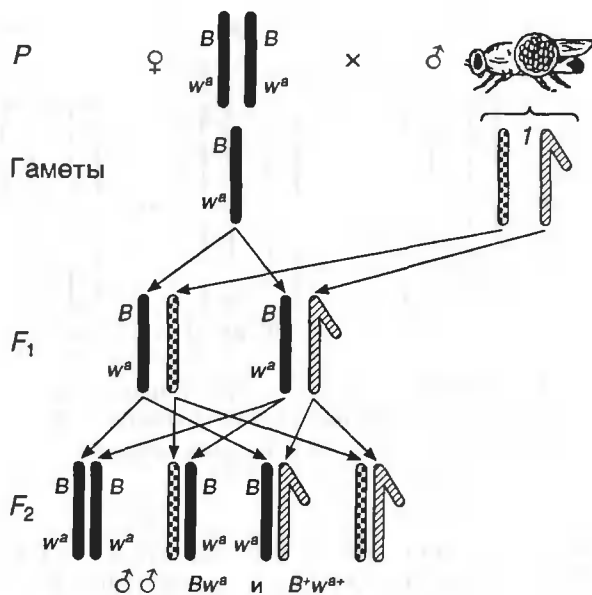


Рис. 6.9. Метод обнаружения рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций у дрозофилы (методика “Меллер-5”). По Лобашеву, 1967.

B – ген полосковидных глаз. w^a – ген абрикосового цвета глаз.

ра выступала бы поведенческая особенность мутантных пчел. В ответ на соответствующий раздражитель они должны были бы автоматически отделяться от нормальных особей. Бензер индуцировал мутации химическими мутагенами, в частности алкилирующим агентом этилметансульфонатом, который вызывает точковые мутации типа замены пар оснований. Выделяли рецессивные, сцепленные с полом мутации, используя главным образом методику “Muller-5” (рис. 6.9).

В этом случае, как показано на рисунке самцов дикого типа, предварительно выдержанных на питательной среде с этилметансульфонатом, скрещивали с самками линии-анализатора, несущими в X-хромосоме инверсии, запирающие (блокирующие) кроссинговер, а также доминантный маркер *Bar(B)* и рецессивный маркер *white-apricot (w^a)*. В F_2 отбирали выщепляющихся самцов нормального фенотипа, т.е. несущих в гомозиготном состоянии X-хромосому, полученную от подвергнувшегося обработке исходного родителя. Таких фенотипически нормальных самцов испытывали по поведению с помощью методики “обратного потока” (рис. 6.10). Суть этой методики заключается в том, что к верхнему концу трубки, составленной из двух частей, в положении А подводили источник света. Через некоторое время большинство испытуемых особей скапливалось в силу положительной фототаксиса у верхнего конца трубки. Затем две половины общей трубки разъединяли и мух, оказавшихся в разных частях, подвергали повторному тестированию. Эту

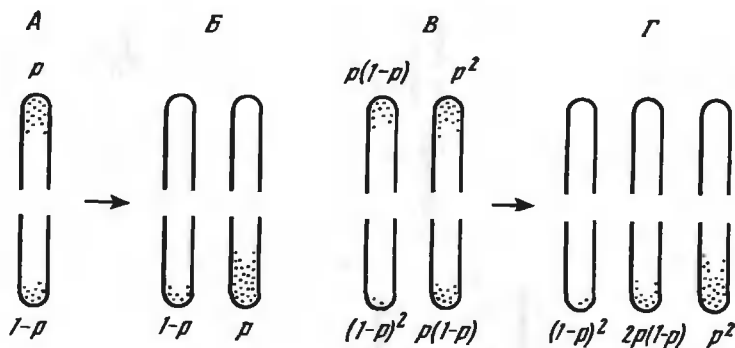


Рис. 6.10. Методика “обратного потока” для выявления мутантов дрозофилы с нарушенной реакцией на свет. По Benzer, 1975

А-Г – последовательные этапы испытания мух.

процедуру повторяли многократно. В результате удалось выделить несколько десятков мутантов, по-разному реагирующих на свет: с отсутствием четкой фотореакции, с отрицательным фототаксисом. Затем эти мутанты изучаются генетически и физиологически.

Эффективный метод выделения термочувствительных неврологических мутантов разработал канадский генетик Дэйв Сузуки (Suzuki), получивший индуцированные мутации, подобно Бензеру, с помощью химических мутагенов. В F_2 от скрещивания мутантных самцов с самками линии-анализатора отбирали нормальных по фенотипу особей и помещали в термостат при температуре 20 °С. У отдельных особей при воздействии повышенной температуры обнаруживалось состояние паралича, так что обездвиженных мух можно было отделить от остальных. Это состояние было обратимым и при температуре 22 °С восстанавливалась нормальная двигательная активность. Сузуки выделил с помощью этого метода ряд неврологических мутаций, локализованных в X-хромосоме и в третьей паре аутосом.

Полученные поведенческие мутанты необходимо в дальнейшем анализировать на предмет установления числа генов, к которым относятся выделенные мутации. Возможны три ситуации: 1) все выделенные по данному признаку мутации будут результатом мутирования одного гена; 2) каждая отдельная мутация затронет свой локус; 3) мутирует несколько локусов, причем некоторые из них повторно.

Чтобы определить принадлежность двух рецессивных мутаций к одному и тому же или разным генам, используют так называемый функциональный тест на аллелизм. Для этого их объединяют в гетерозиготном состоянии в потомстве от скрещивания гомозиготных родителей:

$$\frac{a_1^+ a_2^+}{a_1 a_2} \text{ (1) или } \frac{a_1 a_2^+}{a_1^+ a_2} \text{ (2),}$$

где a_1 и a_2 – мутации по данному поведенческому признаку. Если у гетерозиготных особей F_1 выявится аномальное поведение, то можно считать, что анализируемые мутации не комплементарны друг другу и являются аллелями одного гена, и их генотип следует записывать как (1). Если же у гетерозигот обнаружится нормальное поведение, то это означает, что в анализ вовлечены комплементарные, взаимодополняющие мутации, которые относятся к разным локусам.

Следующий этап генетического анализа поведенческих мутантов заключается в картировании локусов, по которым распределены выделенные мутации. Это картирование осуществляется в помощью обычных методов классической генетики.

Хотта (Hotta) и Бензер (Benzer) разработали методику, позволяющую найти точку приложения действия мутантного поведенческого гена, т.е. указать те клетки развивающегося зародыша дрозофилы, на судьбе которых сказывается нарушение его функций. Методика заключается в получении большого числа мозаичных особей, несущих разные по величине мутантные и нормальные части тела и в исследовании их с помощью электрофизиологической техники.

В основу методики был положен разработанный Стёртевантом (Sturtevant) принцип картирования генов на хромосоме путем определения частоты рекомбинаций, которая является функцией расстояния между ними. В 1929 г. Стёртевант предложил тот же принцип для составления мозаичной карты бластодермы. Частота появления особей с разным генотипом тех или иных частей тела должна зависеть от расстояния между участками бластодермы, из которых возникают эти части. Стёртевант изучил около 400 мозаиков, но не обработал полученные данные. Через 40 лет по ним была составлена карта распределения различных зачатков в бластодерме, клеточной массе, которая дает начало зародышу мухи (fate map). Сеймур Бензер изучил еще 700 мозаичных особей и определил в условных единицах расстояние между различными зачатками на карте бластодермы. Он ввел единицу этого расстояния, которую назвал в память Стёртеванта “стёртом”. **Один стёрт** – это расстояние, эквивалентное возможности, что в 1% случаев среди всех изученных мозаичных мух две структуры будут иметь различный генотип. Приведем пример расчета расстояния между двумя внешними маркерами по этому принципу – кутикулой ноги и антеннами. Из 100 изученных мозаиков у 25 генотип кутикулы ноги и антенн был разным (у 12 нормальным был генотип ноги и мутантным – антенн, и у 13, наоборот, мутантным был генотип ноги и нормальным – генотип антенн). В таком случае пропорция мух, у которых эти две структуры имели разный генотип, равна

$$\frac{12 + 13}{100} = 25\%.$$

Это означает, что расстояние зачатковой ноги от зачатковых антенн равно 25 стёртам. Зная расстояние третьего внешнего маркера от ноги и антенн, можно найти его местоположение на карте с помощью простого геометрического построения. Для него возможны два место-

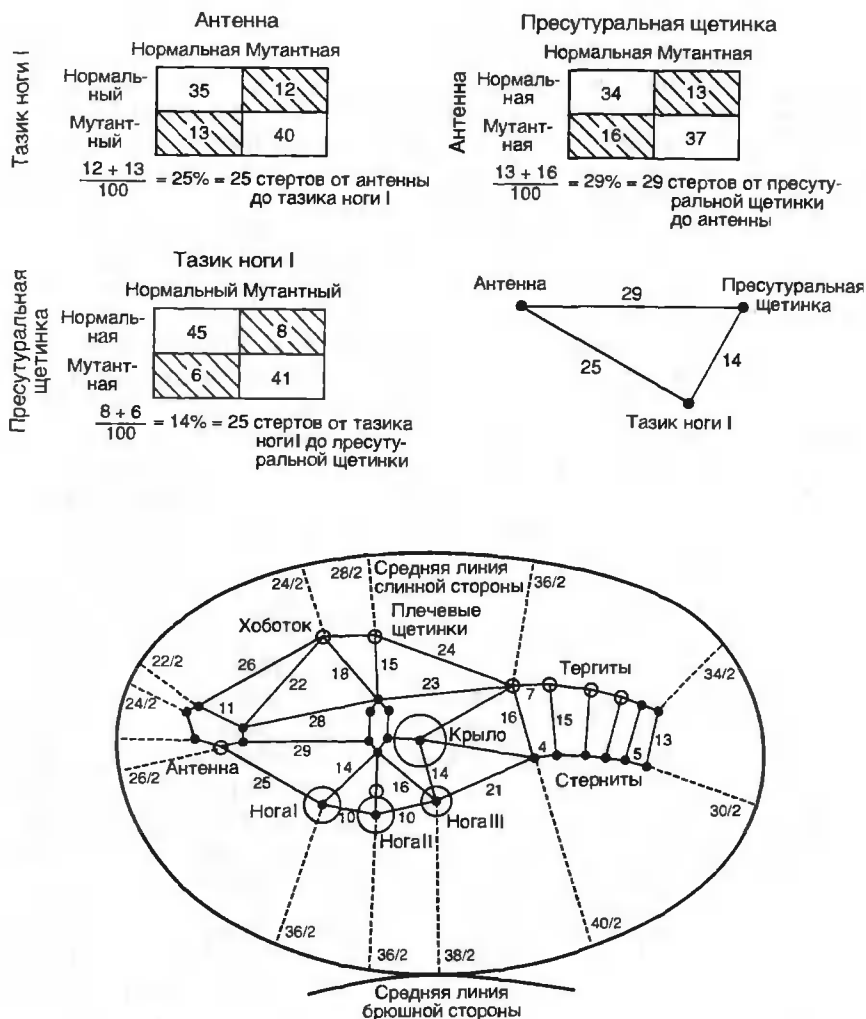


Рис. 6.11. Методика определения распределения презумптивных закладок у эмбрионов дрозофилы по методу Стертеванта-Бензера (объяснение в тексте).

положения. Выбор между двумя возможностями требует картирования по отношению к добавочному маркеру (рис. 6.11).

В подобных экспериментах используют линии мух, несущих кольцевую X-хромосому, которая очень легко теряется при первых делениях развивающегося яйца. События, ведущие к образованию мозаичной особи, представлены на рис. 6.12.

Если в развивающихся яйцах одна из двух X-хромосом – кольцевая, то у части эмбрионов первое деление приведет к тому, что одно

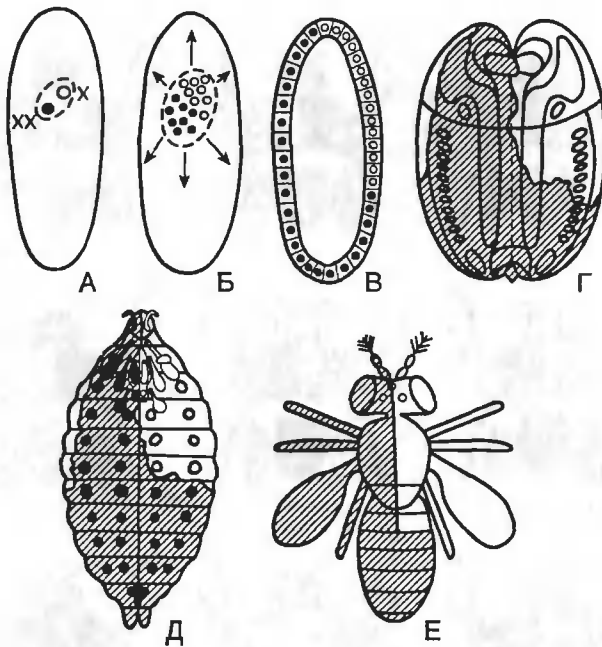


Рис. 6.12. Стадии формирования мозаичной особи.

А – потеря одной X-хромосомы при первом делении ядра, *Б* – миграция ядер к поверхности, *В* – формирование смешанной бластулы, *Г* – карта презумптивных органов, *Д* – карта личиночных структур, которые дают начало частям тела имаго, *Е* – мозаичная особь после метаморфоза. По Бензеру.

дочернее ядро будет по-прежнему нести две X-хромосомы, а второе ядро – только одну X-хромосому. Последний тип ядер (XO) у дрозофилы дает начало самцовым тканям. Примерно после 12 делений ядра мигрируют к поверхности яйца, образуя бластодерму. Группы ядер сохраняют выраженную обособленность, так что XX (самочья)-группа занимает одну часть поверхности, XO (самцовая)-группа покрывает оставшиеся части. В связи с тем, что у дрозофилы ориентация веретена по отношению к оси яйца при первом делении произвольна, линия раздела между XX и XO-тканями может рассечь эмбрион в любом направлении: в одних случаях вдоль по середине, в других поперек и наискось. Когда после метаморфоза вылупляется взрослая муха, она оказывается гинандроморфом, т.е. состоит из самцовых и самочных частей.

Для использования этой системы в решении той или иной проблемы вводят с помощью кроссинговера рецессивный ген, ответственный за какой-либо поведенческий признак, в обычную (некольцевую) X-хромосому, маркированную другими рецессивными генами, вызывающими, например, белую окраску глаз, желтую окраску тела и появление раздвоенных щетинок. В XX частях тела взрослой мухи эти рецес-

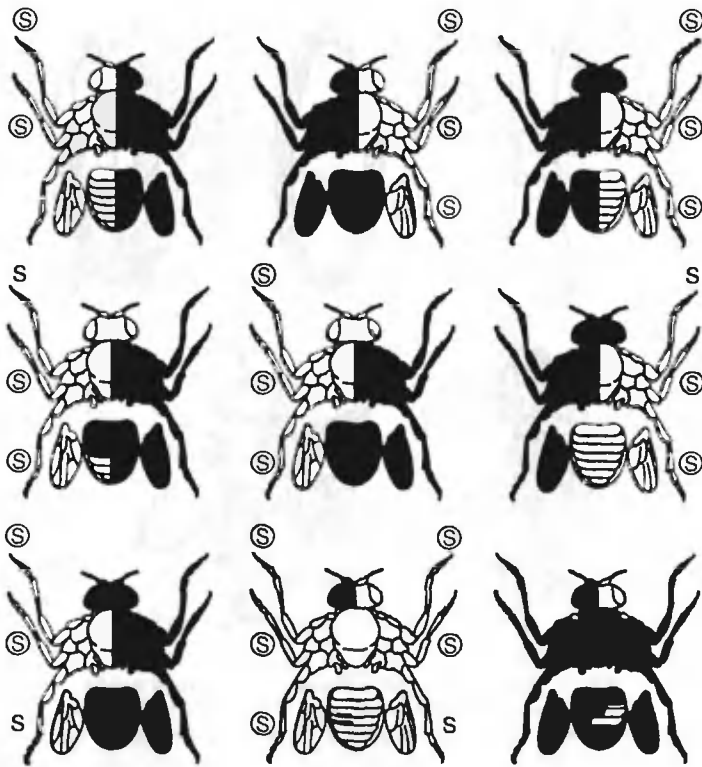


Рис. 6.13. Гиперкинетические гинандроморфы дрозофилы. По Ikeda, Kaplan, 1970.

Черным цветом обозначены ткани с женским карьотипом, а белым – ткани с мужским карьотипом. Знаком S обозначена дергающаяся ножка, знаком S в кружочке – ритмические импульсы в двигательном центре, связанном с данной конечностью.

сивные гены не проявляются, поскольку будут доминировать их нормальные аллели второй X-хромосомы, но в XO частях тела эти мутантные гены проявятся, так как будут находиться в гомозиготе. Следовательно, при рассмотрении такой мухи можно и заметить мутантные участки тела и среди всех полученных гинандроморфов отобрать тех, которые нужны для дальнейших исследований. Более того, можно, как отмечалось, конструировать двухмерные карты участков бластодермы, которые дают начало различным частям тела, такие карты позволяют связывать отклонения от нормального поведения с различными анатомическими структурами. Примером построения такой карты служит локализация места действия сцепленного с полом гена дрозофилы *hyperkinetic* (*Hk*). Гомозиготные по этому гену самки, а также гомозиготные самцы под влиянием эфирного наркоза беспорядочно подергивают лапками. На рис. 6.13 показаны девять разных гинандроморфов,

мутантных по гену *Hk*. Всего было получено 600 мозаичных мух, у которых “мужские” участки поверхности тела отличались от участков с женским генотипом по цвету тела, глаз и форме щетинок. На этих животных действовали эфиром и изучали аномальные движения конечностей. Оказалось, что беспорядочное подергивание каждой лапки осуществляется независимо от других лапок, причем наблюдается соответствие между движением той или иной лапки и генотипом ее кутикулы (покрова насекомых).

Обнаружены три отдельных очага, т.е. те структуры, которые будучи затронуты действием мутантного гена, вызывают у мухи аномальное поведение. Каждый такой очаг соответствует одной ножке на той или иной стороне тела муха. Все эти очаги находятся в той области blastoderмы, из которой формируется вентральная (брюшная) нервная цепочка. Получены электрофизиологические данные о ненормальности функционирования торакального (грудного) ганглия у мутантов *Hk*. Действие этого гена осуществляется автономно, так что правая и левая стороны каждого торакального ганглия функционируют независимо друг от друга, и активность отдельных мотонейронов в про-, мезо- и метаторакальных отделах торакального ганглия автономна. Можно, следовательно, определить местоположение различных частей зачатка торакального ганглия на карте blastoderмы.

Хотта и Бензер аналогичным способом изучали начальные стадии ухаживания самцов за самками у дрозофилы – преследование самок и вибрацию крыльев, и конечные этапы – попытку спаривания и само спаривание. Результаты исследования гинандроморфов показали, что контроль за ориентацией мозаиков по отношению к самкам и вибрацией крыльев (стимулирующей самку) осуществляется церебральным ганглием. Мозаичные особи, у которых все тело, за исключением головы, имело женский кариотип, вели себя как самцы (преследовали самок и вибрировали крыльями). Попытки к спариванию совершают мозаики, у которых голова и торакс – самцовые, что подразумевает участие в регуляции этого процесса как головного, так и торакального ганглиев. Для осуществления спаривания требуется также нормальное мужское строение гениталиев. Когда к гинандроморфам подсаживали самцов дикого типа, оказалось, что наличие у мозаичных мух женских гениталиев и формы брюшка провоцировало ухаживание самцов. Однако для того, чтобы мозаичная муха вела себя как самка, ее центральная нервная система должна оставаться женской.

При исследовании некоторых поведенческих мутаций выяснилось, что они имеют не один локус действия. В частности, *dorp-dead* мутанты характеризуются тем, что они нормально развиваются и живут до определенного момента, после которого у них появляется некоординированная походка, и в течение нескольких часов после этого они погибают. Исследование таких мух с мутантной головой и грудью или брюшком показало, что мутантной должна быть поверхность района головы, чтобы появился синдром. Однако некоторые мухи с нормальной головой проявляют описанную патологию и, наоборот, некоторые особи с мутантной головой характеризуются нормальным поведением. Иными

словами, эти данные указывают на то, что фокус drop-dead мутации близок к поверхности головы, но в то же время он там не локализован. Картирование фокуса на бластуле показало, что для проявления drop-dead синдрома мутантным должен быть район бластодермы, образующий головной мозг. Гистологическое изучение головного ганглия мутантных мух подтвердило расчет фокуса действия этой мутации, обнаружив дегенеративные изменения нейронов головного ганглия. Анализ индивидуумов с мозаичной головой (билатеральный мозаицизм) показал, что левая и правая половины головы должны быть мутантными, чтобы возник синдром. Большинство билатеральных мозаиков благополучно выживает вследствие того, что одна нормальная сторона мозга может обеспечить какой-то фактор нейроэндокринной природы, который предотвращает патологические изменения в другой части мозга.

Выделение и клонирование различных генов, ответственных за осуществление поведенческих реакций у различных животных, позволяют использовать их в качестве зондов для изоляции гомологичных генов у человека. В 1965 г. проблемы генетики человека привлекли особое внимание, поскольку оказалось, что наличие лишней Y-хромосомы (XYY генотип) в геноме мужчины способствует большей его агрессивности по сравнению с обычным хромосомным набором (XY). В последнее время достигнут определенный прогресс в изучении генетических и молекулярно-генетических аспектов поведения человека: так, ген шизофрении локализован в 5-й хромосоме, психоза – в 11-й хромосоме, маниакально-депрессивного психоза – в 11-й хромосоме и в X-хромосоме. Подробнее эти проблемы будут рассмотрены в последующих главах.

ЛИТЕРАТУРА

- Актуальные проблемы генетики поведения. Л.: Наука, 1975.
- Зорина З.А., Полетаева И.И., Резникова Ж.И.* Основы этологии и генетики поведения. М.: Изд-во МГУ, 1999.
- Крушинский Л.В.* Формирование поведения животных в норме и патологии. М.: Изд-во МГУ, 1960.
- Крушинский Л.В., Зорина З.А., Полетаева И.И., Романова Л.Г.* Введение в этологию и генетику поведения. М.: Изд-во МГУ, 1983. 1998. 2-е изд.
- Полетаева И.И., Романова Л.Г.* Генетические аспекты поведения животных // Итоги науки и техники.. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 42.
- Трут Л.Н.* Очерки по генетике поведения. Новосибирск: Наука, 1978.

НЕКОТОРЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ АСПЕКТОВ ПОВЕДЕНИЯ

Поведение бактерий и простейших: молекулярный мотор

Поведение одноклеточных организмов, таких, например, как бактерии, достаточно простое, благодаря чему становится легко доступным изучение некоторых простейших элементов поведенческих реакций, каковым является движение, обусловленное мерцанием жгутиков или ресничек. Бактерии отвечают на химическое раздражение движением по направлению к источнику раздражения (положительный хемотаксис) или, наоборот, стараются “убежать” подальше от этого раздражителя (отрицательный хемотаксис). Эта их реакция обусловлена функционированием своеобразного молекулярного мотора, от которого зависят вращения жгутика, действующего наподобие пропеллера и направляющего движение бактерии (рис. 7.1). Молекулярный механизм, лежащий в основе функционирования жгутика, был исследован у *Escherichia coli*. Этот организм имеет четыре различных типа мембран-связанных рецепторов, которые воспринимают химический сигнал и инициируют внутриклеточный ответ. Эти рецепторные белки принадлежат к семейству генов, названному transducers. Каждый белок этого семейства имеет варибельный рецепторный домен, который располагается в периплазматическом пространстве и консервативный домен – внутри цитоплазмы. Хеорецепторные белки цитоплазматической поверхности формируют комплекс с двумя цитоплазматическими белками – CheA и CheW. Первый и хеорецептор взаимодействуют напрямую, а второй усиливает эту ассоциацию. CheA определяет ответ клет-

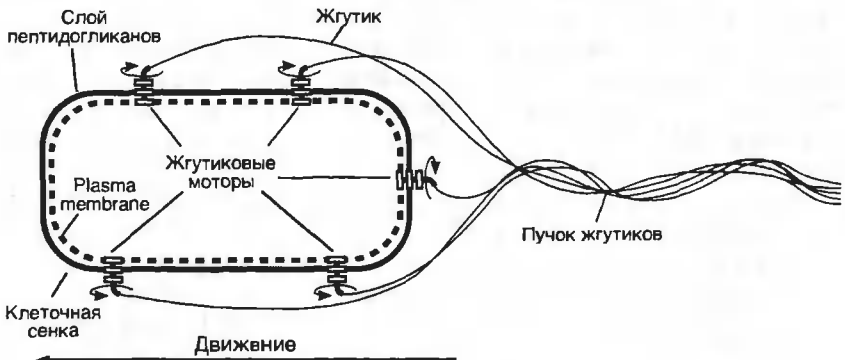


Рис. 7.1. Схема жгутикового “мотора”, определяющего двигательное поведение бактерий. Объяснение в тексте. По Klug, Cummings, 1994.

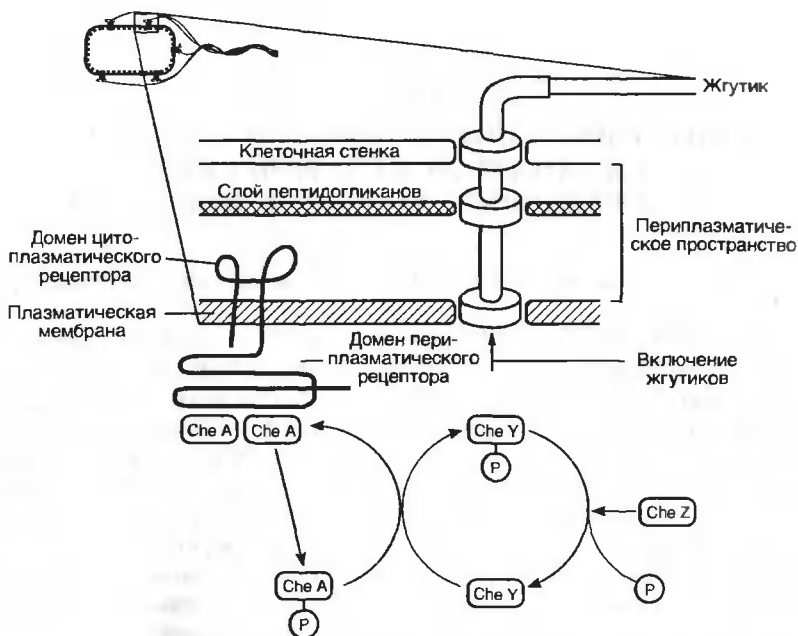


Рис. 7.2. Сенсорная трансдукция во время бактериального хемотаксиса. Стимуляция трансмембранного рецептора ведет к фосфорилированию CheA с помощью CheW. Фосфорилированный белок CheA передает фосфатную группу к CheY. Фосфорилированный CheY взаимодействует с работающими ресничками, чтобы изменить направление их вращения. CheZ инактивирует CheY перемещением фосфатной группы. По Klug, Cummings, 1994.

ки на химический стимул, в то время как CheA мутанты утрачивают чувствительность к ним. Изменение конформации хеморецептора, вызванное связыванием или высвобождением сенсорных молекул, инициирует передачу внутриклеточных сигналов. Этот сигнал передается посредством фосфорилирования группы цитоплазматических белков, которые действуют как молекулярные выключатели, определяющие направление вращения жгутика. В присутствии молекулы-репеллента изменение конформации хеморецептора вызывает увеличение скорости фосфорилирования CheA (рис. 7.2).

Вслед за фосфорилированием CheA фосфорилируется CheY. Фосфорилированный CheY связывается с основанием жгутикового мотора и поддерживает вращение жгутика по часовой стрелке, клетка начинает кувыркаться, хаотически двигаться и переключать направление движения. Другой белок – CheZ выключает действие CheY, ускоряя дефосфорилирование CheY.

В присутствии аттрактанта цикл фосфорилирования обращается (дает обратный ход, reverse), снижая скорость фосфорилирования

CheA, который, в свою очередь, замедляет фосфорилирование CheY. Дефосфорилированный CheY поддерживает вращение жгутика против часовой стрелки, что ведет к движению клетки по направлению к аттрактанту. Цель этого движения – оценить химический градиент и соответственно изменить движение клетки, направляя ее к аттрактанту (пище) и прочь от репеллента.

Хеморецепторы организуются в кластеры, локализованные на полюсах клетки, но не кластеризуются вблизи основания клеточного мотора. CheA и CheW локализируются в полярной цитоплазме, при этом CheA белок ассоциируется с внутренней клеточной мембраной. У мутантов, утративших все четыре рецептора, белки CheA и CheW случайно распределены в цитоплазме, что доказывает зависимость полярной локализации продуктов этих генов от присутствия рецепторов. Изучение мутантов CheW продемонстрировало, что этот белок требуется для агрегации и полярной локализации рецепторов. У делеционных CheW мутантов комплексы CheA рецепторов распределяются в цитоплазме случайно. Эти данные показывают, что сигнал трансдукции инициируется не формированием комплекса, но конформационными его и сенсорных молекул изменениями.

Таким образом, хемотактическое поведение *E. coli* обуславливается взаимодействием множества геновых продуктов с включением процесса фосфорилирования белков.

Поведение простейших особенно подробно изучали на примере *Paramecium aurelia*. Локомоторные реакции этого объекта находятся под контролем поверхностной возбудимой мембраны. Направление и частота биения ресничек коррелируют со сдвигом электрического потенциала мембраны, обусловленным изменениями потенциалзависимой проводимости кальция. Изменения направления движения ресничек вызывают изменение направления перемещения парамеции. Известны мутанты *Rawl* (что значит пешка, передвижение которой по шахматной доске имеет определенные ограничения). Они в отличие от особей дикого типа не могут плыть назад и могут быть температурочувствительными. Эта мутация проявляется в специфическом моногенном дефекте, связанном с отсутствием возбудимости мембраны, несущей реснички. Реснички при этом не затрагиваются мутацией. При морфологических исследованиях у парамеций были обнаружены импрегнирующиеся серебром наподобие нервных волокон нити, связывающие основания ресничек (базальные тельца). Предполагалось, что система этих нитей координирует движение ресничек, однако доказательств этому не получено.

Генетика поведения нематод

Одним из удобных объектов для исследования генетических и молекулярно-генетических основ поведения служит червь *Caenorhabditis elegans*, введенный в экспериментальную практику Бреннером (Brenner) и характеризующийся значительной простотой своих поведенческих реакций. Взрослый червь достигает 1 мм длины и состоит всего из 959

клеток, 350 из которых являются нервными клетками. В связи с этим оказалось возможным построить на основании анализа гистологических срезов трехмерную модель нервной системы этого объекта. Бреннер индуцировал у *C. elegans* множество поведенческих мутаций и попытался выявить корреляцию поведенческих реакций со структурными и молекулярными особенностями этих мутантов.

Caenorhabditis elegans – гермафродит, для которого характерно самооплодотворение, причем сначала продуцируется и запасается сперма, а затем развиваются и откладываются яйца, около 300 у каждой особи. Продолжительность жизненного цикла при температуре 20° С составляет от 3 до 4 суток. Самооплодотворение способствует возникновению гомозиготности, но у одной и той же особи могут возникать различные индуцированные мутации, поэтому в результате нерасхождения хромосом в мейозе постоянно появляется некоторое число самцов (0.1%), которые при скрещивании с гермафродитами переносят ту или иную мутацию, которую и используют в качестве генетической метки: А = 1 на бор аутосом a_1a_2 особи, редко производящие самцов,

– особи, часто производящие самцов,

– самцы.

C. elegans весьма удобна для генетиков поведения, поскольку его легко разводить в лабораторных условиях, он имеет гаплоидный набор из шести хромосом, соответствующих шести группам сцепления.

Развитие этой нематоды своеобразно. Развивающееся яйцо высших эукариот подразделяется на три слоя эмбриональных тканей – эктодерму, мезодерму и энтодерму, каждый из которых дает начало определенным клеточным типам. Например, нервная ткань возникает из эктодермальной закладки, эпителий пищеварительной трубки – из энтодермальной закладки и т.д. У *C. elegans* это правило нарушено: некоторые нейроны у них могут развиваться из мезодермы, причем клетка-предшественник может делиться, продуцируя одну дочернюю клетку, превращающуюся в нейрон (обычно производный эктодермы), и другую – дающую начало мышечной клетке (обычно производную мезодермы). Следовательно, эмбриональные ткани нематоды характеризуются большей пластичностью, нежели у других высокоорганизованных эукариот (рис. 7.3).

Кроме того, у *C. elegans* довольно высок процент клеток, подверженных апоптозу в ходе нормального развития: одна из каждых шести клеток генетически запрограммирована к гибели. Эта гибель полостецифична, так что гибель одной клетки у эмбрионов одного пола не означает, что погибнут гомологичные клетки у эмбрионов другого пола.

Симметрия у *C. elegans* также формируется своеобразно, порой не в результате симметричного деления клеток, но благодаря их активным перемещениям.

Как и у других организмов, важную роль в развитии нематод играют гомеозисные гены. У *C. elegans*, например, у мутантов по локусу *lin-12* нарушено развитие вульвы, эти мутанты стерильны. Вероятно, как и

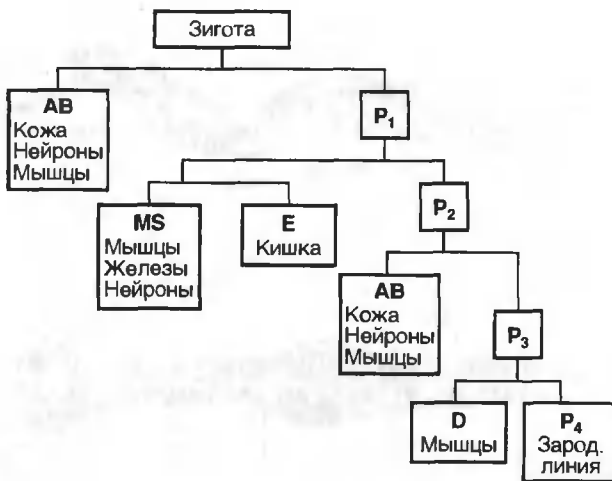


Рис. 7.3. Схема выделения клеточных линий *Caenorhabditis elegans* в процессе индивидуального развития. По Sulston, 1983.

у дрозофилы. функционирование гомеозисных генов регулирует процесс регионализации нервной системы нематод.

C. elegans имеет цилиндрическое, волосовидное, несегментированное тело (рис. 7.4), оставляющее на агаре в чашке Петри легко различимый след, который можно регистрировать и анализировать. Эти видимые бороздки в агаре могут проходить вдоль градиента аттрактантов, вроде химических соединений (циклические нуклеотиды), катионы, щелочные значения pH. Характер расположения бороздок отражает особенности поведения: *ориентацию* – движение вдоль градиента концентрации, включая “боковое” движение головы червя. *Скопление* – постоянное скопление большого числа нематод в какой-либо особой точке градиента. *Привыкание* – наблюдаемое после того, как контейнер и его содержимое делаются привычными для особи. Этот процесс заключается в ознакомлении животного и с градиентом распределения аттрактанта и с самим аттрактантом. Поведение червя изменяется, как только он оказывается в области максимального притяжения, затем он покидает ее, чтобы позднее повторить весь цикл сначала.

Анализ различных мутантов, характеризующихся дефектами кутикулы, позволил прийти к выводу, что ориентирование в химическом градиенте обуславливается сенсорными органами, расположенными на голове животного. Мутантные черви со вздутиями в дистальной части хвоста ориентируются нормально, в то время как наличие таких вздутий на голове делает ориентацию невозможной.

Личиночное развитие *C. elegans* контролируется активностью четырех классов хемосенсорных нейронов. При этом выбор между нормальным развитием и развитием в специализированную личиночную

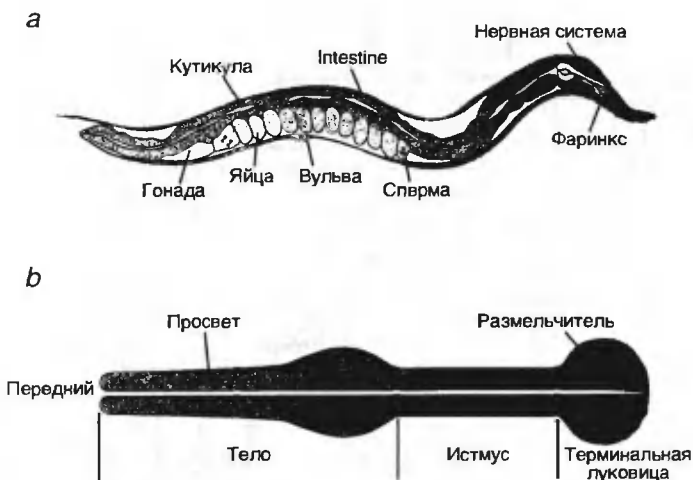


Рис. 7.4. Pharynx (глотка) *C. elegans*.

a – схема организации червя, *b* – схема строения глотки червя. По Klug, Cummings. 1994.

форму, называемую “dauer larva”, питающуюся и способную пережить без пищи несколько месяцев, регулируется конкурирующими средовыми стимулами: пища и “dauer pheromon”. Когда убиваются нейроны классов ADF, ASG, ASI и ASJ, животные развиваются как “dauer” личинки независимо от средовых условий (рис. 7.5). Анализ мутантов, дефектных по “dauer formation” показывает, что хемосенсорные нейроны активны в отсутствие сенсорных входов и что dauer феромон тормозит способность этих нейронов генерировать сигналы, необходимые для нормального развития.

Одной из самых распространенных поведенческих моделей, используемых для анализа генетики поведения *C. elegans*, является пищевое поведение. Его фаринкс является пищевым насосом, состоящим из трех частей: (1) тело (corpus), которое поглощает (ingest) бактерий и (2) isthmus, который проводит бактерий к (3) terminal bulb, где бактерии размалываются и проводятся в кишку (рис. 7.4, *b*).

Фаринкс окружен базальной мембраной и содержит 80 клеток, 20 из которых – нейроны фарингеальной нервной системы (гомолог интрамуральной нервной системы пищеварительной трубки позвоночных). Эта система связана с остальной нервной системой парой нервов. Наличие автономной иннервации позволяет фаринксу нормально функционировать в случае его изоляции *in vitro*.

Только один из 20 нейронов (M4) существен для жизни. Он иннервирует задний isthmus, и в случае его отсутствия isthmus остается закрытым, а бактерии не транспортируются для размалывания и переваривания, так что животное голодает. Черви с интактным M4 нейроном и отсутствующими 19 другими жизнеспособны, хотя эти нейроны необходимы для нормального паттерна питания.

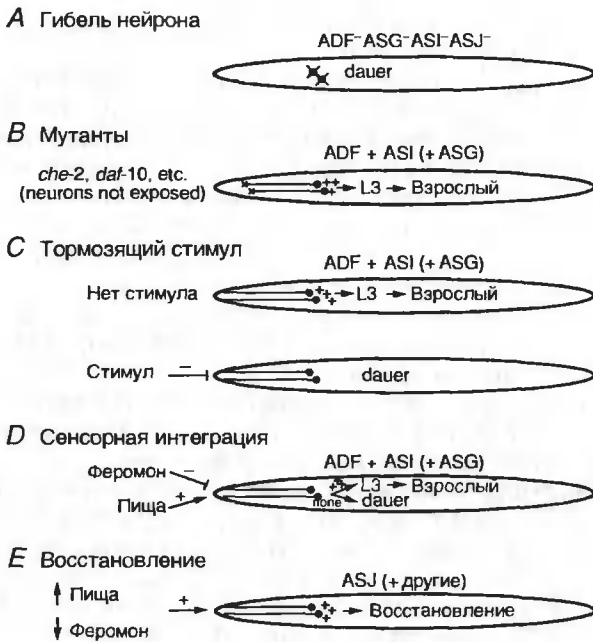


Рис. 7.5. Модель функционирования хемосенсорных клеток при формировании “dauer” личинок.

На каждой диаграмме схематически представлены нематода и ядра и чувствительные отростки хемосенсорных нейронов, включенных в “dauer”-формирование. На каждой диаграмме представлено только два нейрона независимо от действительного числа нервных клеток. Мелкий знак + представляет сигнал, высвобождаемый сенсорным нейроном. Этот сигнал может быть нейротрансмиттером, пептидом, гормоном или электрической активностью.

A – лазером убивают хемосенсорные клетки ADF, ASI, ASJ, что приводит к “dauer” формированию.

B – у мутантов, у которых сенсорные окончания ненормальны и все амфидные хемосенсорные клетки не получают стимулов, “dauer” феномен предотвращается.

C – активность сенсорных нейронов ADF, ASI и, возможно, ASG требуются для того, чтобы животные развились в личинок 3-го возраста (L3) и затем во взрослые организмы. Эта активность тормозится средовыми стимулами (возможно, “dauer” феромонами). Торможение представлено символом).

D – чтобы интегрировать противоположные сигналы пищи и “dauer” феромона, ADF, ASI, ASG нейроны должны одновременно оценить оба сигнала и в зависимости от их соотношения выбрать развитие в направлении L3 или стадии “dauer”. Альтернативно пищевой сигнал может быть оценен другими (неизвестными) нейронами.

E – восстановление от стадии “dauer” зависит от активности ASJ, и в меньшей степени – других хемосенсорных нейронов. Высокая концентрация пищи и низкая концентрация феромона может стимулировать остающиеся ASJ нейроны разрешить развитие в направлении взрослой стадии. По Horvitz, 1996.

Леон Эйвери (Avery) изолировал и охарактеризовал гены, которые контролируют присутствие или отсутствие, паттерн иннервации и функции 20 нейронов, ответственных за пищевое поведение. Было обнаружено 35 генов, локализованных во всех 6 хромосомах, и предполагается, что имеется еще столько же, отвечающих за данную форму поведения. Выявленные этим ученым 52 мутации по своему фенотипическому эффекту можно разделить на три группы. Мутанты *eat* действуют на подвижность фарингеальных мышц и, кроме того, на функционирование мышц стенки тела. Многие мутанты этого типа вызывают нарушение функций некоторых нейронов.

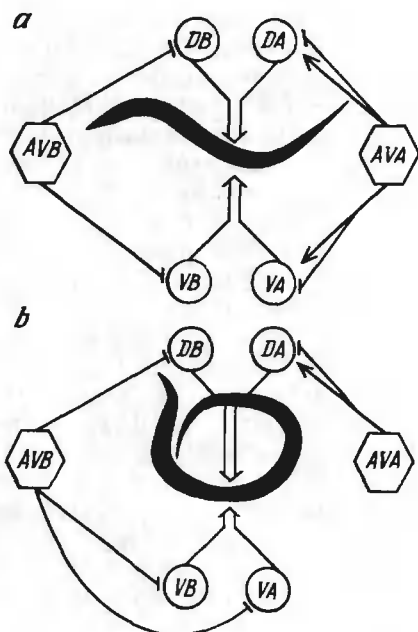
Мутанты *pha* вызывают дефекты фаринкса, которые предотвращают нормальное пищевое поведение и часто вызывают дефекты в морфогенезе и клеточной спецификации.

Третий класс мутантов (*phm* мутанты) обуславливают слабые или нерегулярные сокращения фарингеальных мышц. Они могут также нарушать нейральный контроль мышечной функции.

У *Caenorhabditis* обнаружены также система генов, контролирующая развитие хеморецепторов, которые реагируют на водорастворимые аттрактанты (биотин, лизин, cAMP, ионы натрия и хлора), летучие репелленты (октанол), летучие аттрактанты (диацетил, пиразин, иниазол, бензальдегид, изоамиловый спирт, тиазол), а также температурных рецепторов. Было идентифицировано более 40 генов, кодирующих трансмембранные рецепторы. Эти "рецептороподобные" гены можно подразделить на 6 семейств (*sra*, *srb*, *srg*, *srd*, *sre*, *sro*), основываясь на сходстве последовательностей их ДНК. Однако не было найдено сходства с другими известными последовательностями ДНК, кодирующими трансмембранные рецепторы, за исключением слабой гомологии *sro* гена с генами опсина. Гены одного и того же семейства часто собраны в один кластер. Некоторые из этих кластеров могут ко-экспрессироваться наподобие оперонной системы, однако в некоторых случаях гены из одного кластера экспрессируются в разных нейронах. Предполагается, что в целом геноме *C. elegans* содержится более 100 генов, экспрессирующихся в хеморецепторах. Поскольку *C. elegans* имеет 32 хемосенсорных нейрона, сводимых в 14 типов, можно думать, что каждый хемосенсорный нейрон экспрессирует несколько хеморецепторов. Было, в частности, обнаружено, что один тип хемосенсорных нейронов, так называемый ASK характеризуется активностью по крайней мере четырех различных "рецептороподобных" генов, принадлежащих к разным субсемействам (*sra-7*, *sra-9*, *srg-2*, *srg-8*). Генетические и молекулярные исследования гена *odr-10* показали, что взаимодействие отдельного одоранта со сцепленным с трансмембранным доменом G-белком инициирует ольфакторную трансдукцию. Ген *odr-10* кодирует трансмембранный белок, который экспрессируется только в сенсорных ресничках нейронов типа AWA. Ген *odr-7* кодирует транскрипционный фактор, который принадлежит к суперсемейству ядерных рецепторов и специфически требуется для осуществления сенсорной функции AWA. Нулевые мутанты по этому гену не препятствуют структурной дифференцировке этих нейронов, однако последние теряют способность отве-

Рис. 7.6. Схема связей между моторными нейронами в вентральной трубке червя дикого типа (а) и мутантов *unc-4(e120)* (b).

Стрелки – химические синапсы, T – окончания типа “gap junctions”, кружки – классы моторных нейронов, гексагоны – классы интернейронов. Локомоция обуславливается активностью мотонейронов В-типа. AVB – главный класс интернейронов, связанных с ними. Обратное движение обуславливается нейронами типа А, основными интернейронами для них являются клетки AVA. Нейроны VA в середине тела мутантного червя имеют синаптический вход, который характерен для нейронов В-типа. Видны также изменения в организации синаптических связей интернейронов AVA. Все эти особенности организации данного нейронного модуля ведет к изменению поведенческой реакции червя, так что он сворачивается кольцом, как показано на рисунке. По White et al., 1996.



чать на такие специфичные для них запаховые раздражители как диацетил и пиразин. Они неспособны также экспрессировать ген *odr-10*. Если в геном нулевых по *odr-7* мутантов ввести ген *odr-10* под активным промотором, экспрессирующимся в AVA и AWC нейронах, то восстанавливается хемотаксис к диацетилю, но не к пиразину. Таким образом, наличие белка ODR-10 достаточно для ольфакторного ответа на диацетил, так что данный белок, вероятно, является рецептором к диацетилю.

В последнее время идентифицированы гены, контролирующие нейрогенез у *C. elegans*: *mec-3*, определяющий наподобие гена *cut Drosophila* специфичность типа нервной клетки и гены *unc-5*, *unc-6*, *unc-40*, наподобие гена *fas-1 Drosophila*, контролирующие характер роста нервных отростков. Еще один ген *unc-4* регулирует специфику формирования синаптических контактов VA мотонейронов. У соответствующих мутантов локомоторный дефект коррелирует со специфическими изменениями синаптических связей нейронов этого типа (рис. 7.6).

Оказалось, что еще один ген – *unc-4* кодирует гомеодоменный белок, который функционирует как транскрипционный фактор. Эффект этого гена на развитие соответствующих нейронов экспериментально доказан. Он изменяет паттерн синаптических входов к одному классу моторных нейронов вентральной нервной трубки. У мутантов *unc-4(e120)*, которые характеризуются отсутствием функционирования гена *unc-4*, пресинаптические партнеры VA нейронов замещаются интернейронами, соответствующими мотонейронам VB класса. Эти изменения нейтральной специфичности не сопровождаются сколько-нибудь заметными дефектами нейтральной морфологии или нарушениями роста от-

ростков. Предполагается, что ген *unc-4* регулирует экспрессию небольшого числа генов-мишеней, и продукты этих генов включены в процесс формирования специфического синаптического паттерна.

Простота организации *C. elegans* позволяет изучать и молекулярно-генетические аспекты нейрoхимических особенностей этого объекта. В частности, были выполнены детальные исследования роли G-белка (гуанин нуклеотид-связывающего белка), играющего ключевую роль в модулирующей активности нейронов и мышц, в изменении серотонин-контролируемого поведения *C. elegans*. Оказалось, что мутация гена *goa-1*, кодирующего альфа-субъединицу, вызывает дефекты в поведении, сходные с таковыми у мутантов, которые утрачивают нейротрансмисмиттер серотонин (5-НТ), при этом *goa-1* мутанты частично резистентны к экзогенному 5-НТ. Мутантные животные, утратившие альфа-субъединицу белка G, и трансгенные животные, характеризующиеся гиперэкспрессией соответствующего гена (мутация *goa-1(xs)*), имеют реципрокные дефекты в локомоции, питании и откладывании яиц. У мутантов наблюдаются гиперактивные движения, откладывание яиц и импотенция самцов, у трансгенных животных эти дефекты “исправляются”. Известно, что у нормальных животных все эти события регулируются 5-НТ. Следовательно, белок G опосредует у *C. elegans* многие поведенческие эффекты серотонина.

Половое поведение дрозофилы

Этот вид поведения, который активно изучал российский генетик Л.З. Кайданов, включает последовательность элементов ухаживания самца и ответные реакции самки. Время ухаживания колеблется от нескольких секунд до многих часов, что зависит от степени рецептивности самок и качества стимулирования их самцами. Самцы начинают ухаживать за самками примерно через сутки после выхода имаго из куколки. Процесс ухаживания представляет собой специфический ритуал. Первым этапом этого ритуала является “ориентация” – приближение самца к самке и его остановка в нескольких миллиметрах от нее, при этом он обращает свою голову к брюшке самки (рис. 7.7). На следующем этапе самец похлопывает самку по телу своими передними лапками. В случае, если самка убегает, самец преследует ее до тех пор, пока она не остановится, после чего он снова принимает положение “ориентации”. Затем наступает стадия “вибрации”: самец вытягивает одно крыло, как правило, то, которое расположено ближе к голове самки, и начинает им вибрировать, исполняя при этом видоспецифическую “песню”. Самец может повторять эту “песню” несколько раз, передвигаясь то к голове, то к ее брюшке, оставаясь обращенным к ней головой. Следующая стадия ухаживания называется “лизание”. Самец вытягивает свой хоботок и лижет гениталии самки. В случае, если самка раскрывает в ответ свои гениталии и расставляет крылья, самец предпринимает попытку копуляции, изгибая свое тело так, что происходит контакт гениталий. Копуляция продолжается в среднем около 20 минут. Описанные элементы ухаживания свойственны самцам дрозофилы дикого типа и адресуются



Л.З. Кайданов (на переднем плане) и Л.И. Корочкин (стоит) председательствуют на Всесоюзной конференции по генетике поведения. 1987 г.

обычно девственным самкам. Оплодотворенная самка пресекает попытки ухаживания самца, препятствуя копуляции выпячиванием яйцеклада. Существенную роль в осуществлении ритуала ухаживания играют ольфакторные, зрительные и звуковые сигналы.

Основным пусковым сигналом для инициации ухаживания являются ольфакторные сигналы (феромоны). Если из девственных самок выделить органический экстракт, то самцы, воспринимающие летучие компоненты такого экстракта, начинают ухаживать друг за другом. Установлена химическая природа этого феромона, он оказался гептакозадиеном. Оплодотворенные самки выделяют "отталкивающий" феромон. Американский генетик Роллин Ричмонд (Richmond) предполагал, что это продукт разрушения содержащегося в семенной жидкости цис-вакценилацетата специфической эстеразой самца, кодируемой геном *estb* и передаваемой при копуляции самкам. И еще одно вещество тормозит ухаживание самцов за уже оплодотворенными самками – углеводород 7-трикоцен, передаваемый самцом самке, после чего она начинает его выделять, подавляя ухаживание самца. Уровень содержания трикоцена у девственных самок составляет 20 нг, после оплодотворения он достигает 60–70 нг.

Л.З. Кайданов отселекционировал линии дрозофилы с высокой и низкой половой активностью. Оказалось, что активность тканеспеци-

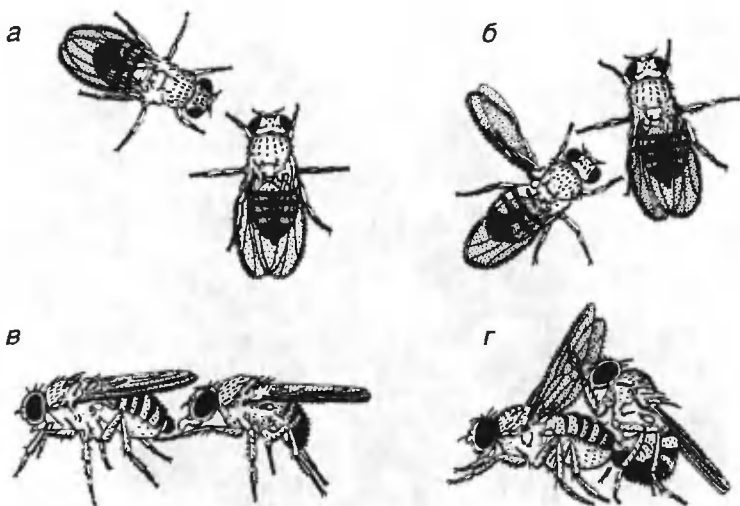


Рис. 7.7. Поведенческая реакция при спаривании мух *Drosophila melanogaster*. По Burnet, Connolly, 1974.

а-г – последовательные этапы "ухаживания" самца.

фической эстеразы в семявыносящем потоке первой линии была значительно выше, нежели у мух с генетически детерминированной низкой половой активностью.

Эффекты зрительных сигналов находятся в зависимости от генов, связанных с регуляцией развития зрительной системы. Если, например, самкам подсадить самцов с разными аллелями гена *white* (глаза белого цвета, лишённые пигмента), то предпочтение в спаривании будет оказано самцам с более пигментированными глазами. Немецкий генетик Мартин Гейзенберг (Heisenberg) обнаружил, что мутанты *optomotor-blind* (*omb^{H31}*), которые имеют достаточно хорошую разрешающую зрительную способность, но неспособны отвечать на оптокинетику стимуляцию, менее активно ухаживают за самками, чем самцы дикого типа. Сходные отклонения в поведении обнаруживает мутант *pot-receptor – potential* (*potr^A*), у которого отсутствует функция всех фоторецепторов глаза.

Наконец, рецептивность самки к ухаживанию самца в значительной мере зависит от информации, передаваемой звуковыми сигналами. У самок, гомозиготных по мутации *antennaless* (отсутствие антенн), существенно снижается рецептивность. Точно так же рецептивность снижается у мутантов с частичной редукцией *арист*. У бескрылых самцов удлинняется время копуляции, при этом копуляция происходит с меньшей частотой, чем в норме. У мутантов *period* (*per*) с изменённым ритмом циркадной активности значительно увеличивается время до достижения копуляции по сравнению с самцами дикого типа.

У дрозофилы, как и у многих других животных, обнаружено явление гомосексуализма, когда самцы преследуют друг друга охотнее, чем

самок. Оказалось, что эта аномалия поведения также контролируется генетически и является моногенным признаком. Соответствующий ген выделен и клонирован, и более того, у человека обнаружен гомологичный ген, сходный с выявленным у дрозофилы, что указывает на выраженный консерватизм генетической системы, контролирующей половое поведение у животных. Доктор Д. Хамер (Hamer) с коллегами, используя цитогенетический и генно-инженерный метод, локализовал этот ген у человека в X-хромосоме, в зоне q28. Как обнаружил нейробиолог из Сан-Диего Симон ЛеВэй (Simon LeVay) при исследовании мозга пациентов, скончавшихся от СПИДа, у гомосексуалистов передний отдел гипоталамуса – отдела мозга, ответственного за сексуальную активность, в 2 раза отличается по размерам от соответствующей структуры гетеросексуалов и напоминает таковую женщин. В этой области описано особое ядро, которое назвали INAH-3, оно у гомосексуалов мельче, чем у гетеросексуалов, и равно по своим размерам INAH-3 женщин. Кроме того, еще одно ядро гипоталамуса, супрахиазматическое, то самое, что управляет ритмической активностью, в 2 раза мельче у гомосексуалов, чем у гетеросексуалов.

Известна также генетически детерминированная аномалия поведения, названная “лесбийский фенотип”. В этом случае самки начинают ухаживать как за самками, так и за самцами, однако без попыток копуляции.

Таким образом, нормальное половое поведение дрозофилы связано с функционированием системы генов, функционирующих как в центральной, так и в периферической нервной системе, а также в органах воспроизведения и некоторых других органах, принимающих участие в процессе ухаживания самцов и рецептивности самок.

Молекулярно-генетические аспекты полового поведения моллюсков

Известны случаи, когда молекулярно-генетические события начинают каскад поведенческих реакций. Об этом свидетельствуют исследования регуляции полового поведения моллюска *Aplysia*, выполненные группой Шелера (Sheller) в США и в некоторых других лабораториях. Они изучали сложную поведенческую реакцию кладки яиц. Эта кладка представляет собой длинный шнур, содержащий более миллиона яиц. Как только под действием сокращающихся мышц протока гермафродитной половой железы яйца начинают выталкиваться наружу, улитка прекращает двигаться и питаться. Она захватывает шнур яиц ртом и, двигая головой вперед-назад, способствует его выходу из протока железы, а затем скручивает в моток. Специальная железа во рту выделяет клейкое вещество, которое прилипает к клубку яиц. В конце концов животное энергичным движением головы прикрепляет кладку к твердой основе, например к поверхности камня.

Были идентифицированы скопления нейронов, которые регулируют комплекс этих поведенческих актов, затем удалось показать, что

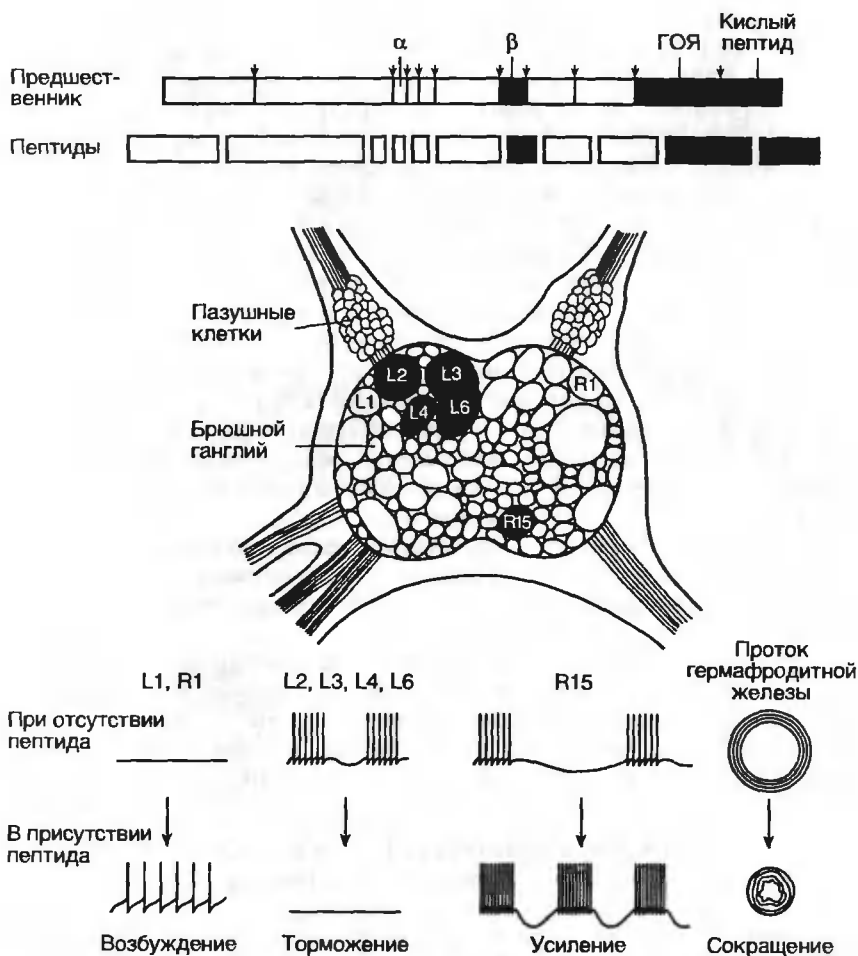


Рис. 7.8. Предшественник ГОЯ – белок, в состав которого входит несколько активных пептидов.

В молекуле предшественника (вверху) имеются 10 точек (отмечены стрелками), в которых полипептидную цепь могут разрезать ферменты эндопептидазы. При расщеплении по всем точкам должно образоваться 11 пептидов (второй рисунок сверху). Известно, что пазушные клетки выделяют четыре из них: альфа- и бета-факторы, ГОЯ и кислый пептид. Пептиды функционируют в качестве медиаторов, влияя определенным образом на активность конкретных нейронов брюшного ганглия, бета-фактор возбуждает клетки L1 и R1, альфа-фактор тормозит клетки L2, L3, L4, L6, ГОЯ усиливает импульсацию нейрона R15. ГОЯ выделяется также в кровоток и действует как гормон, вызывая сокращение мускулатуры в протоке гермафродитной железы. Внизу схематически показано, как действуют пептиды и ГОЯ на свои мишени. По Р. Шеллеру, Р. Акселю, 1984.

нейроны активируются продуктами гена, кодирующего гормон откладки яиц (ГОЯ), причем сначала образуется белок-предшественник, в состав которого входит несколько активных фрагментов-пептидов (рис. 7.8). Этот предшественник расщепляется специальными ферментами, и продукты расщепления влияют на функции нервных клеток, которые управляют кладкой яиц, стимулируя одни и тормозя другие. Так бета-пептид возбуждает клетки L1 и R1, альфа-фактор тормозит клетки L2, L3, L4, L6, ГОЯ усиливает импульсацию нейрона R15, а также выделяется в кровоток и действует как гормон, вызывая сокращение мускулатуры в протоке гермафродитной железы. От мозаики распределения активированных и заторможенных нейронов зависит успех реакции в целом.

Гомологичный с моллюском пептид был обнаружен и у дрозофилы. Это Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRF-amide). Этот пептид так же, как у аплизии, первоначально входит в состав более сложного предшественника. Этот предшественник синтезируется в нейросекреторных клетках мозга и, как и у аплизии, регулирует реакцию откладывания яиц, демонстрируя достаточно универсальный характер описанного механизма.

Генетическая регуляция биоритмов

Одной из характерных особенностей поведения различных животных является феномен периодичности, проявляющийся в том, что периоды активности чередуются у них с периодами покоя. Известно, например, что лев бодрствует 3–4 часа в сутки, а остальное время спит. Такого рода ритмы принято называть циркадными (от латинских слов “circā”, что означает “вокруг” и “dies”, что означает “день”). В некоторых случаях животные могут ориентироваться во времени суток благодаря способности, называемой временной памятью. Например, дрессируя пчел, можно добиться того, что они будут искать корм в определенное время дня. Если в течение нескольких дней давать пчелам корм в одно и то же время, они будут продолжать искать его в это же время даже после прекращения такого кормления. Иными словами, животные обладают своеобразными биологическими часами, которые подобно нашим современным часам связаны с циклическими процессами и могут быть независимыми от чередования дня и ночи. Отдельные случаи эндогенной циклической активности были описаны у животных еще в 1894 г., когда А. Кизель (A. Kiesel) обнаружил, что миграция пигмента у членистоногих продолжается и в отсутствие чередования света и темноты.

У млекопитающих выявлен ритм колебаний содержания гликогена в печени, у насекомых суточная периодичность вылета имаго из куколок, у раков – суточные колебания окраски, у человека – способность просыпаться точно в определенное время или в течение дня точно соблюдать определенные сроки, не пользуясь внешними указателями времени. Проводились поиски тех центров, которые “управляют” процессами циклической активности. У тараканов, например, таковыми оказались нейросекреторные клетки головного мозга. Нейральная природа

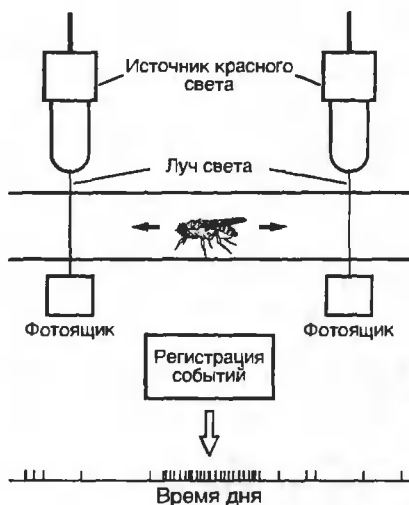


Рис. 7.9. Способ регистрации циркадного ритма у дрозофилы. Объяснение в тексте. По Snustad et al., 1995.

контроля биоритмов, возможно, связанная с активностью определенных групп нейронов и нейросекреторных клеток мозга, присуща, по-видимому, и другим животным. У млекопитающих, например, показано, что центром, управляющим биоритмами, является супрахиазматическое ядро гипоталамуса – отдела мозга, особенно богатого нейросекреторными клетками.

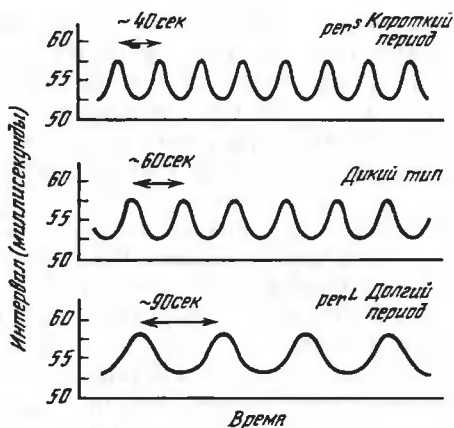
Такая эндогенная ритмическая активность имеет наследственную основу. Особенно большие успехи были достигнуты в этом направлении при изучении биоритмов у дрозофилы, у которой открыт соответствующий ген *period* (*per*), локализованный в X хромосоме, в области 3В1-2 и контролирующий периодичность активности мухи в течение суток. Для измерения этой активности муху помещают в стеклянную трубку, каждый конец которой освещается красным светом. Муха не может видеть красный цвет. Пересечение ею луча света с каждой стороны трубки регистрируется и характеризует уровень активности животного (рис. 7.9). В период большей активности муха чаще пересекает луч света.

Известны мутанты дрозофилы с изменением характера циклической активности. В частности, *per⁰* аллель характеризуется аритмичностью поведения, *per^S* (*short*) аллель детерминирует цикличность с 19-часовым интервалом вместо “нормального” 24-часового, *per^L* (*long*) изменяет интервал “дикого типа” на 29-часовой. Лocus *per* контролирует также время вылета имаго из куколок. Мухи *per⁺* вылетают из куколок утром, когда наиболее благоприятны условия для того, чтобы расправить и высушить крылья и отправиться в полет. Паттерн вылета синхронизирован в соответствии с 24-часовым циклом. Мутанты *per⁰* не обнаруживают в этом отношении цикличности и могут вылететь в любое время дня и ночи. Мутанты с удлинненным и укороченным циклом имеют и соответственно измененные паттерны вылета. Интересно, что такой элемент ухода за дрозофилой, как песня, также зависит от гена *per* (рис. 7.10).

Естественно, встает вопрос о молекулярно-генетических механизмах регуляции циркадного ритма. Ген *per* дрозофилы был изолирован и идентифицирован его белковый продукт PER. Ген *per* имеет 7 кб длины, 8 экзонов, первый из которых является некодирующим и синтезирует транскрипт длиной 4,5 кб. При этом возникает по крайней мере три различных РНК. Лocus *per* был секвенирован, его продукт-полипептид

Рис. 7.10. Зависимость периодичности песни ухаживания у дрозофилы от циркадного паттерна:

у самцов дикого типа песня ухаживания имеет 60-секундный период, *per^S* мутант имеет 40-секундный период, *c-per^L* мутант имеет 90-секундный период. По Snustad et al., 1995.



имеет молекулярный вес около 127 000. Две минорных РНК продуцируются посредством альтернативного сплайсинга близ 3' – конца, так что возможно образование трех белков, однако значение их неизвестно. Продукт *per* локуса образуется во многих тканях, включая эмбриональную, куколочную и взрослую нервную систему, пищевод, кишки, яичники. Этот продукт локализуется преимущественно в клеточных ядрах и, возможно, действует как транскрипционный фактор.

Он сходен с белками, кодируемыми тремя другими генами, кодирующими (а)человеческий *aryl hydrocarbon* рецептор, ядерный транспортер этого рецептора и *singleminded* белок *Drosophila melanogaster*. Эти гены содержат домен размером примерно в 270 аминокислот, который используется для димеризации и взаимодействия с партнером, который содержит ДНК-связывающую область и потому функционирует как транскрипционный регулятор.

Известны и другие гены, оказывающие влияние на биоритм – это X-сцепленные *Clock* и *Andante* локусы, слабо действующие в направлении укорочения или удлинения цикла соответственно. Белок PER, относящийся к протеогликанам, экспрессируется в мозге, в глиальных клетках и в некоторых нервных клетках. Экспрессируется он и в других тканях. Были предприняты попытки обнаружить клетки, ответственные за контроль циркадного ритма. В результате в мозге был найден комплекс латеральных нейронов, обнаруживающих циркадные колебания в содержании PER белка. Оказалось, что синтез PER белка и *per* мРНК характеризуется ритмичностью, у мутантов *per⁰* эта ритмичность нарушается. Найдено, что белок PER взаимодействует с другими белками, в результате чего тормозится синтез *per* мРНК, и уровень содержания этой РНК снижается ночью, так что синтезируется меньше соответствующего белка. У мух дикого типа цикл репрессии-дерепрессии синтеза *per* РНК подчинен 24-часовому ритму. Если в геном мух *per⁰* ввести индуцируемую тепловым шоком копию гена *per⁺*, обозначенную *hspcper*, то транскрипционные животные перестают проявлять ритмичность циркадного ритма и переходят в своем поведении на 24-часовой цикл активности.

С помощью иммуногистохимической реакции были показаны соответствующие циркадному ритму колебания в содержании PER белка в глазных нейронах дрозофилы и в мелких нейронах мозга, которые тру-

дно идентифицировать. Сходные колебания содержания гомологичного PER белка были обнаружены в глазах двух видов моллюсков – гастропод *Aplysia* и *Bulla*. У столь различных организмов как некоторые млекопитающие (например, мышь) и зеленая водоросль ацетабулярия (*Acetabularia*) обнаружены последовательности ДНК, гомологичные области гена *per*, кодирующие серию треонин-глициновых повторов. Поскольку протеогликаны, сходные с PER белком, содержат серин-глициновые повторы, можно предполагать, что межвидовые гомологии представляют протеогликаны, неродственные ритмическим или пейсмейкерным функциям. Точно так же ген *frc*, контролирующий циркадные ритмы у *Neurospora crassa*, содержит последовательности ДНК, гомологичные области, ответственной за синтез треонин-глициновых повторов. Эти данные свидетельствуют в пользу существования некоего универсального молекулярно-генетического механизма, регулирующего цикличность поведенческих реакций.

Недавно удалось выявить еще один интересный факт: PER белок взаимодействует с другим белком, названным timeless (TIM). Оба соответствующих гена включаются утром, и синтезируемая ими мРНК накапливается в течение дня (рис. 7.11). По ходу дня уровни PER и TIM возрастают. Эти белки накапливаются в очень высокой концентрации, взаимодействуют друг с другом, образуя комплекс, который проникает в ядро и останавливает транскрипцию собственных генов. Уровни *per* и *tim* снижаются в течение ночи, с последующим снижением уровней белков PER и TIM. В конце концов уровень содержания этих белков становится столь низким, что они перестают образовывать комплекс и репрессировать транскрипционную активность генов *per* и *tim*. Эти гены вновь активируются и начинают активно транскрибировать, так что уровень белков PER и TIM снова возрастает. Такой генетически детерминированный функциональный цикл и лежит в основе биоритмов. При этом возникает вопрос о том, каким образом реализуется зависимость биоритмов от света. Оказалось, что TIM белок инактивируется светом. При освещении разрушается как TIM белок, так и PER-TIM комплекс, а *tim* и *per* гены становятся транскрипционно активными. Когда степень освещенности снижается (сумрак к ночи), уровень белка TIM возрастает, вызывая выключение генов *per* и *tim* с последующим снижением уровня PER и TIM белков. Экспериментальное освещение животных в ночное время вызывает деструкцию TIM белка и вновь устанавливает биологические часы. Механизм разрушения TIM белка светом неизвестен. Тем не менее, циркадный ритм является одной из удобных моделей, демонстрирующих связь поведенческих реакций с молекулярными событиями.

У *Neurospora crassa* был обнаружен локус *frequency* (*frq*) – функциональный аналог гена *per*. Ограниченное сходство между белками PER и FRQ было обнаружено в области, содержащей пары Thr-Gly и Ser-Gly. Позднее было найдено сходство PER с другими белками. Общий с ними домен был обозначен как PAS и имеет 51-аминокислотные повторы внутри 270-аминокислотной области в терминальной части PER. Первый PAS-повтор (PAS A) опосредует белок-белковые взаимодействия.

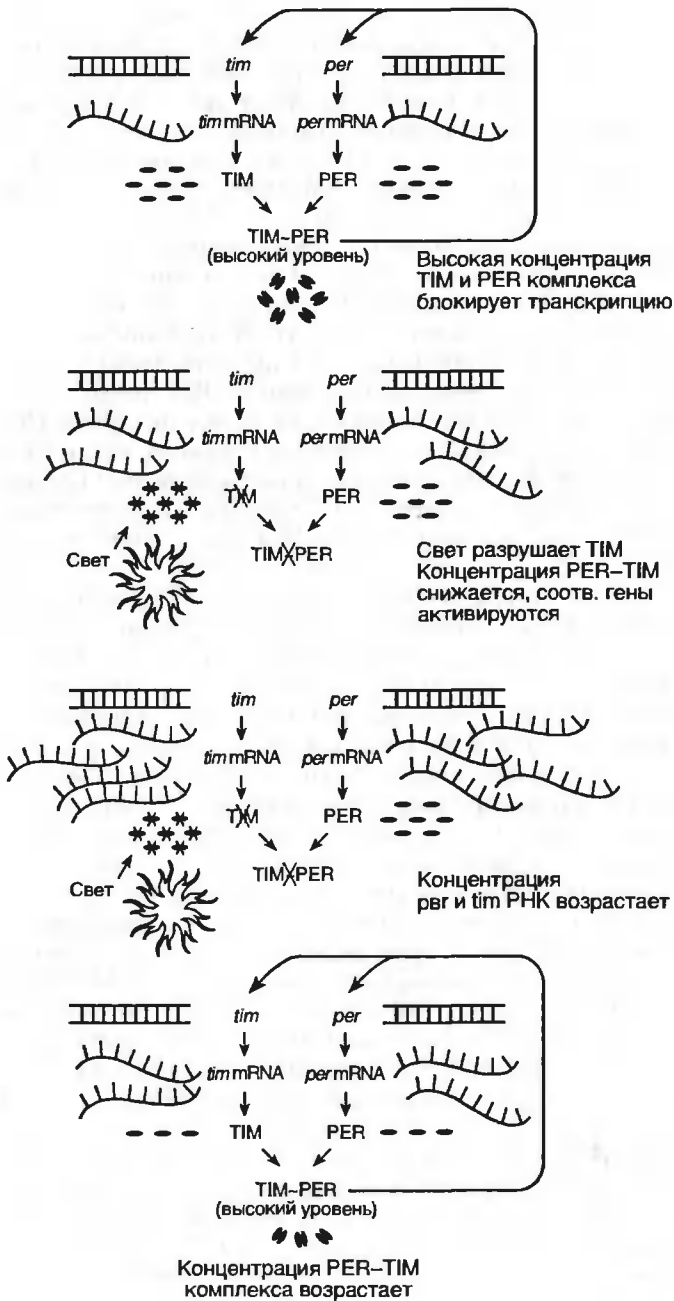


Рис. 7.11. Модель взаимодействия PER и TIM белков в регуляции циркадного ритма дрозофилы. По Snustad et al., 1995.

Другие PAS-содержащие белки имеют также ДНК-связывающие домены. Следовательно, PER принадлежит к семейству белков, некоторые представители которого являются транскрипционными факторами, так что сам PER может быть транскрипционным регулятором. В то же время PER не имеет ДНК-связывающего домена, но ген *per* содержит в 5'-области E-боксы – мишень для bHLH белков и, возможно, именно этот тип ДНК-связывающих молекул компенсирует *per* отсутствие ДНК-связывающего домена. Но, как упоминалось, PER образует димер с продуктом гена *tim*, а TIM не имеет последовательности, связывающейся с ДНК, а также PAS области. PER-TIM-димеризация обнаружена и у дрожжей, в S2 клетках культуры тканей и *in vivo*. В опытах на клетках S2 был обнаружен второй PAS-повтор (PAS B), взаимодействующий с TIM. Эта область была обозначена как цитоплазматически локализованный домен (CLD) и, если он делетирован, PER транспортируется в ядро даже в отсутствие TIM. Точно так же, если делетирован CLD в карбокси-терминальном конце TIM, последний транслоцируется в ядро даже в отсутствие PER. Таким образом, димеризация двух белков маскирует CLD и разрешает ядерную транслокацию. Биологическая значимость этой димеризации подтверждается и тем, что она найдена у других объектов.

Ген *per* экспрессируется в нервной и многих не-нервных тканях. Естественно, для оценки роли этого гена в поведении особенно важен анализ экспрессии PER и TIM в центральной нервной системе. Оба продукта выявлены в фоторецепторах и латеральных нейронах ЦНС (LNs). Фоторецепторы обнаруживают циклическую динамику колебаний содержания PER и TIM, и это опосредует ритм циркадной фоточувствительности. Исследование различных *per* трансгенов, генетических мозаиков и некоторых мутантов показало, что маленькая группа LNs, экспрессирующих *per* и *tim*, является комплексом пейсмейкерных клеток, ответственных за генерацию циркадных локомоторных циклов. Было также обнаружено, что большая часть белка PER головного мозга синтезируется в глиальных клетках. В торакальном ганглии экспрессия PER ограничивается только глиальными клетками. Продукция белка PER в торакальном ганглии контролирует 60-секундную песню любви у самцов *Drosophila melanogaster*. Мутанты, изменяющие длительность этой песни, параллельно изменяют и циркадный ритм. Очевидно, экспрессирующая *per* ген глия регулирует каким-то образом функционирование нейральных модулей, детерминирующих те или иные циклы.

Функционирование генов *per* и *tim* в не-нервных органах, например в мальпигиевых сосудах (аналог почек) насекомых также циклично даже у декапитированных мух. При культивировании клеток кольцевых желез дрозофилы циклическая синтез белка PER сохраняется в течение недели, и, следовательно, возможен автономный характер регуляции циркадного ритма.

Ген, гомологичный *per*, был обнаружен у гигантского шелкопряда *Antheraea pernyi*, которому свойствен четкий циркадный ритм, при этом выявлены соответствующие биоритму колебания синтеза *per* мРНК в

головном мозгу насекомого, а также содержания белка PER в ядрах фоторецепторных клеток. Кроме того, в мозгу шелкопряда найдено 8 нейросекреторных клеток, предполагаемых пейсмекеров (водителей ритма), циклически продуцирующих PER.

Химерный мозг и поведение

Что такое химеризм?

Термином химера принято обозначать монстра, построенного из частей различных животных. В биологии под химерой понимают организм, развившийся из двух слившихся зачатков от различных индивидуумов или составленный из тканей двух разных генотипов. Различают агрегационный химеризм, получаемый агрегацией различных яиц, инъекционный химеризм, получаемый инъекцией клеток внутрь бластоцисты, и трансплантационный химеризм, получаемый с помощью различных методов трансплантации тканей. Сейчас мы можем выделить еще один вид химеризма, молекулярный химеризм, когда в геном какого-либо организма вводят чужеродный ген и получают таким способом трансгенных животных. Различные варианты химеризма используются и в нейрогенетике для исследования генетической детерминированности тех или иных поведенческих признаков.

Влияние различных трансплантаций на поведение

Некоторые интересные результаты были получены в экспериментах с гомотипическими трансплантациями различных отделов мозга. Так, материал из эмбриональной закладки *testum* мозга рыбки *Tilapia macrocephala* был имплантирован в мозг реципиента того же вида и возраста. После созревания реципиентов испытывали в экспериментах по приобретению некоторых навыков. Некоторые экспериментальные животные продемонстрировали более быстрое усвоение этих навыков по сравнению с контролем, так что им под силу было решать даже такие задачи, которые рыбы решать неспособны. Эти различия коррелировали с различиями в структуре мозга (рис. 7.12).

Значительные успехи в этом же направлении были достигнуты с помощью ксенопластических трансплантаций. Активно занимавшийся данной проблемой в 30-е годы Г. Гирсберг (Giersberg) поставил три вопроса: 1) каковы регулятивные способности нервной системы в случае ксенотрансплантации; 2) как складываются после операций такого рода взаимоотношения центральной и периферической нервной системы; 3) будет ли изменяться поведение животного в соответствии со спецификой трансплантата. Автор проводил трансплантации эмбриональной нервной ткани между жабами (*Bufo calanita*, *B. vulgaris*, *Pelibates*) и лягушками (*Rana fusca*, *R. arvalis*, *Hyla*). Иногда экспериментальные лягушки *R. arvalis* с приживленным трансплантатом мозга жабы не пры-

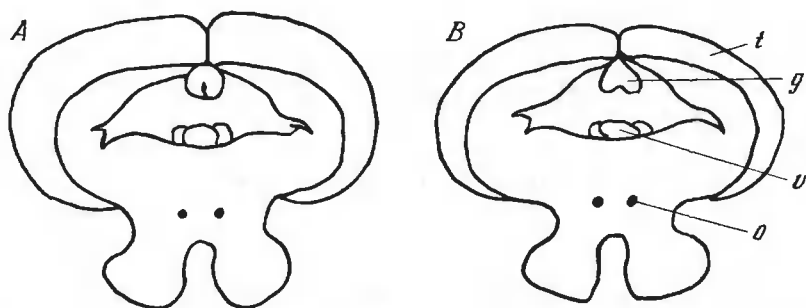


Рис. 7.12. Мозг подопытной (А) и контрольной (Б) с трансплантатом дополнительной нервной ткани рыбки *Tylapia*. По Bresler, Bitterman.

гали, подобно лягушкам, а ползали наподобие жаб. Как и жабы, они пытались копать норы.

В сходных опытах Г. Андрес (G. Andres) и Е. Росслер (E. Rossler) трансплантировали эмбриональную нервную ткань мозга между *Xenopus laevis* и *Hymenochirus boettgeri*, которые различаются по поведению и морфологии мозга. *Hymenochirus* – хищник, *Xenopus* – нет, Головастики *H. boettgeri* с мозгом *X. laevis* не проявляли поведения, свойственного хищникам, но абсорбировали еду из воды посредством засасывания и фильтрации. В России М.А. Александрова и Л.В. Полежаев проводили трансплантации эмбриональной ткани мозга между эмбрионами *Rana temporaria* и *Xenopus laevis*, принадлежащих к разным родам. *X. laevis* с трансплантатом нервной ткани *R. temporaria* были нежизнеспособны. Поведение *R. temporaria* с кусочком мозга *X. laevis* было сходно с таковым донора. Например, эти экспериментальные животные оставались в воде подобно *X. laevis* и не ловили мух, как это делают нормальные травяные лягушки, но поедали мотыля или другую пищу, заглатывая ее, как это делают шпорцевые лягушки. Гистологические исследования свидетельствовали о том, что трансплантат чужого мозга переживал, дифференцировался и устанавливал контакты с мозгом хозяина (рис. 7.13).

Вообще следует отметить, что возможности ксенотрансплантации в пределах позвоночных достаточно велики. Какое-то время (до 3–4 дней) переживает нервная ткань эмбрионов амфибий в мозгу мышей и наоборот.

Недавно была продемонстрирована структурная и функциональная совместимость нервной ткани позвоночных и беспозвоночных. Нервные клетки насекомых (*Periplaneta americana*) и эмбриональные нервные клетки птиц культивировали вместе, и оказалось, что они могут устанавливать между собой синаптические связи. Показана возможность межвидовых трансплантаций нервной ткани у моллюсков и у дрозофилы.

Наконец, оказывается, возможно переживание и развитие эмбрио-

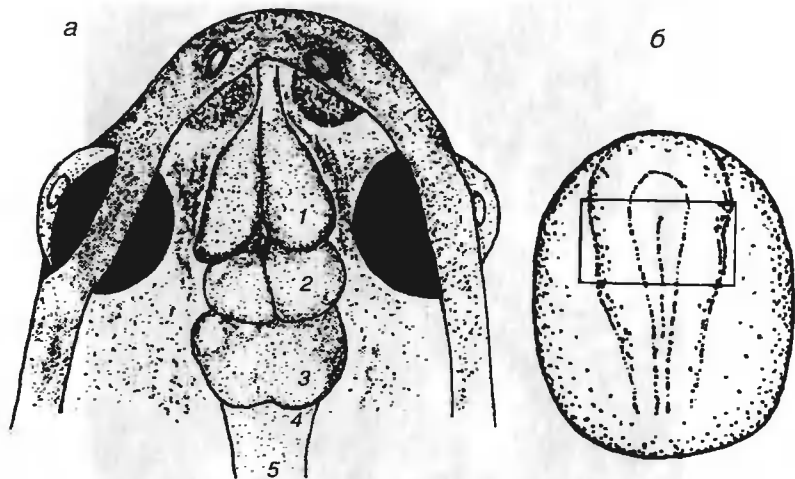


Рис. 7.13. Схема опытов М.А. Александровой и Л.В. Полежаева.

a – область зачатка мозга лягушки, избранная для трансплантации в опытах М.А. Александровой и Л.В. Полежаева, *б* – мозг травяной лягушки после трансплантации зачатка мозга шпорцевой лягушки. 1 – передний мозг, 2 – промежуточный мозг, 3 – средний мозг, 4 – мозжечок, 5 – продолговатый мозг.

нальной нервной ткани дрозофилы в мозге амфибий и млекопитающих. При трансплантации в желудочек развивающегося мозга лягушки эмбриональные нервные клетки дрозофилы дифференцируются, формируют нейропилль, образуют ганглиоподобные скопления, устанавливают контакты с мозгом хозяина (рис. 7.14). В мозге млекопитающих они дифференцируются компактной группой и также отправляют свои отростки внутрь ткани хозяина. Интересен морфогенетический эффект ксенотрансплантата: Л.И. Корочкин и С.В. Савельев показали, что он блокирует образование глиального рубца, стимулирует васкуляризацию области трансплантата и рост отростков нервных клеток. Это обстоятельство было использовано хирургами для лечения болезни Паркинсона. Это заболевание, выражающееся в дрожании различных частей тела, связано с гибелью дофаминэргических нервных клеток в области стриатума. Его лечат хирургическим путем, трансплантируя дофаминэргические нервные клетки эмбрионов человека с целью восполнения недостаточности этих клеток и соответствующего медиатора у пациентов. Успеху оперативного лечения препятствует образование глиального рубца, которых как бы изолирует трансплантат от ткани мозга хозяина, так что процент излечения не очень высок. Добавление к трансплантируемой эмбриональной нервной ткани человека эмбриональных клеток дрозофилы блокировало образование глиального рубца, что значительно повышало эффективность оперативного вмешательства. Кроме того, ксенотрансплантат оказывает определенное влияние на поведение реципиентов-лягушек. В качестве теста на поведение в данном случае были использованы особенности реакции всплытия контрольных и экспериментальных взрослых шпорцевых лягушек, необходимой им для дыхания атмосфер-

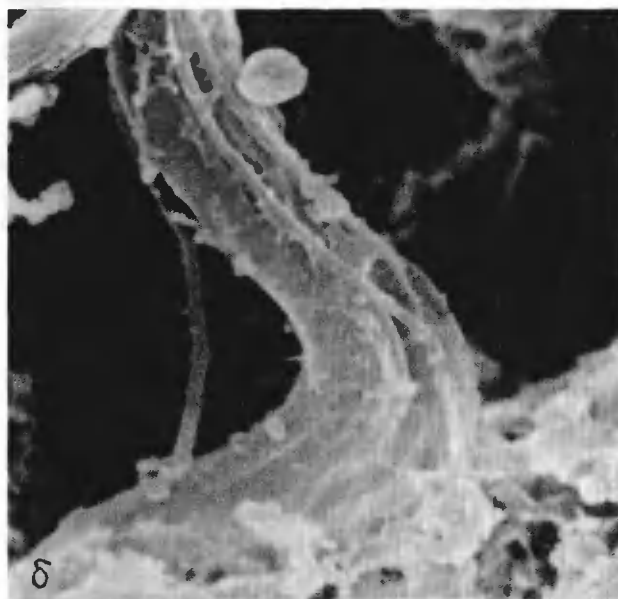
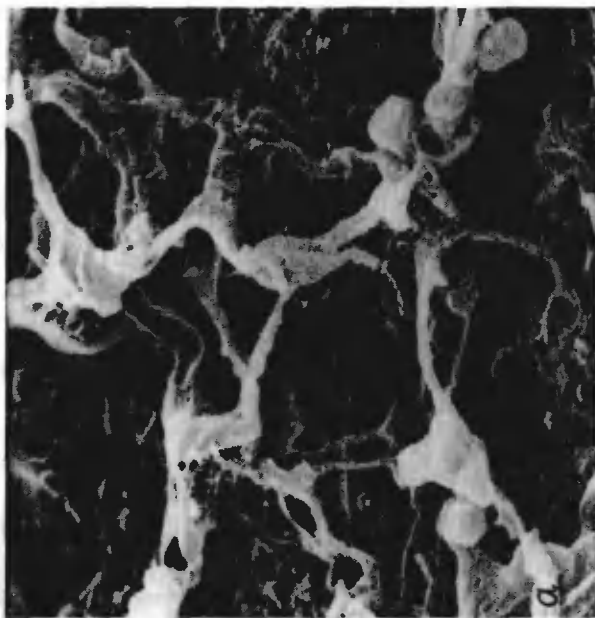


Рис. 7.14. Электронномикроскопическое сканирование подопытных животных с химерным мозгом.

а – ганглиоподобные образования, формируемые трансплантатом эмбриональных нервных клеток дрозофилы в желудочке мозга хозяина. *б* – отростки нервных клеток дрозофилы прорастают в мозг реципиента, используя в качестве субстрата вырост эпендимной клетки мозга хозяина. По Корочкину, Савельеву.

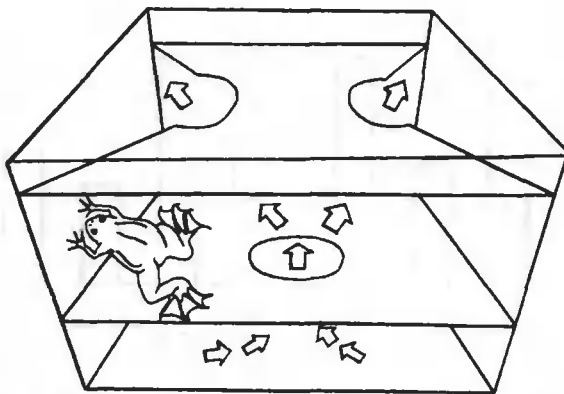


Рис. 7.15. Схема лабиринта, использованного в экспериментах Корочкина и Савельева по изучению поведения лягушек с химерным мозгом.

ным воздухом. Наблюдения проводили в специально сконструированном вертикальном лабиринте. Стенки его и верхнюю площадку изготовили из прозрачного, а нижнюю площадку из матового пластика. Нижняя имела один выход в центре, а верхняя – два по краям. Животное помещали под нижнюю площадку и 30 минут следили за его поисками выхода из лабиринта (рис. 7.15).

Фиксировали общее время активных попыток перед всплытием, время прохождения между нижней и верхней площадками, количество поисковых периодов между всплытиями, предпочтение правому или левому выходу в верхней площадке и возвращение под нижнюю площадку после вдоха. Всех животных обследовали каждый день на протяжении недели, в некоторые дни дважды, причем среди экспериментальных выделили две группы особей: первая – с нервными клетками трансплантата (от дрозофилы), меченными флуоресцеином, вторая – с немечеными. После проведения каждого из 50 опытов лягушат наркотизировали, выделяли мозг, фиксировали его в 4%-ном формальдегиде, затем материал обрабатывали для исследования в световом и сканирующем электронном микроскопе, чтобы убедиться в приживлении и развитии трансплантата у подопытных животных. В целом наблюдения показали, что для лягушек массой 3,5–6,0 г средний интервал между всплытиями к поверхности аквариума составил 3–4 мин. Однако их можно было удерживать под водой и в течение 3 ч. без видимых негативных последствий. Вместе с тем у экспериментальных особей время общей активности было вдвое меньше, они вели себя спокойнее, чем контрольные. Количество всплытий для дыхания у тех и других было одинаковым. А вот число выходов из лабиринта лягушек с химерным мозгом – в два раза больше. Этот результат однако характерен лишь для экспериментальных животных, в мозгу которых содержались не меченные флуоресцеином нервные клетки дрозофилы. У особей же с мечеными этим марке-

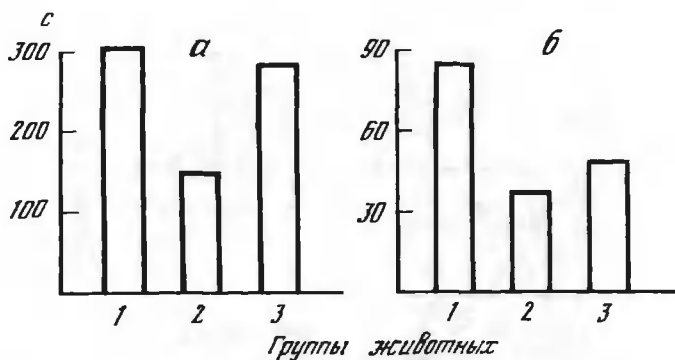


Рис. 7.16. Анализ поведения лягушек с ксенотрансплантатами.

а – диаграмма времени общей поисковой активности шпорцевой лягушки. б – диаграмма количества активных периодов шпорцевой лягушки. 1 – контроль, 2 – опыт без флуоресценции, 3 – опыт с флуоресцеином. Ордината: а – среднее время (с) общей поисковой активности, б – среднее число поисковых периодов животного за 30-минутный цикл наблюдений. По Корочкину, Савельеву.

ром клетками общая активность была близка к контрольным. Однако последние предпринимали в два раза меньше попыток для поиска выхода из лабиринта, чем контрольные лягушки, т.е. выглядели более спокойными и “рассудительными”, нежели контрольные (рис. 7.16).

Гинандроморфизм (половой мозаицизм) и поведение

Под гинандроморфизмом – понимают половую аномалию, при которой одна часть организма является женской, а другая – мужской. Гинандроморф может получаться, когда, например, в одном из двух XX бластомеров одна из X-хромосом будет элиминирована, а в другом бластомере сохраняются обе половые хромосомы. В таком случае из XX-бластомера разовьются “женские структуры”, а из XO-бластомера – “мужские”.

Половое поведение гинандроморфных химер включают все возможные случаи – ухаживание за самцами, ухаживание за самками, а также ухаживание и за самцами и за самками. Установлено, что у *Drosophila* и осы *Habrobracon* половое поведение детерминировано полом мозга, а у домашней мухи – полом брюшка. Интересны эксперименты, поставленные на осе *Habrobracon* Уайтингом (Whiting) в конце 30-х годов. У ос гинандроморфы выводятся иным способом, нежели ранее описанный, они появляются из аномальных яиц с двумя ядрами, из которых лишь одно оплодотворяется. Женская часть развивается из диплоидной половины, а мужская – из неоплодотворенной гаплоидной.

Оказалось, что поведение насекомого зависит от того, каков генотип тканей его головы. В норме самки активно реагируют на гусениц

огневки *Ephestia kuhniella*, вытягивая брюшко вперед к низу, так что жало и антенны направлены вперед. Затем оса медленно подползает к гусенице и вонзает в нее жало, не выбирая для этого какого-либо определенного места. В момент укола антенны движутся над поверхностью тела гусеницы. Когда брюшко выпрямляется, жало втягивается назад, а оса всасывает жидкости, выделяющиеся из совершенно неподвижной гусеницы после укола ее яйцекладом. Впоследствии оса откладывает яйцо в тело своей жертвы. Самцы на гусениц не реагируют, даже избегают их. Как только появляются самки, они возбуждаются и сразу уже пытаются покрыть самок. Один и тот же самец способен успешно спариться несколько раз с одной или с несколькими самками. Во время копуляции он вибрирует крыльями и антеннами. Копуляция длится до двух минут. Поведение гинандроморфов, у которых в мозгу перемешана мужская и женская ткань, извращено. Оно зависит от генетической конституции клеток мозга (мужская или женская) и не зависит от генетической конституции половых желез. Такие особи ухаживают за личинками и жалят самок.

Трансплантация ткани мозга и поведение насекомых

Метод трансплантации широко использовался для изучения полового диморфизма по поведению у насекомых. В частности, была продемонстрирована зависимость организации нервных центров от половой специфичности рецептивных полей. У самцов моли *Manduca sexta*, у самцов *Bombux mori* и у других насекомых установлено наличие в антеннах длинных волосковоподобных ольфакторных сенсилл, отсутствующих у самок (так называемые трихоидные сенсиллы). Их наличие определяет особенности полового поведения самцов, реагирующих на запахи самки и летящих по направлению к ней. В соответствии с этими особенностями периферического сенсорного аппарата устроена и ЦНС, различающаяся у самцов и самок, а именно в мозгу самцов присутствует так называемый макрогломерулярный комплекс (см. гл. 5).

Как уже отмечалось, в экспериментах, поставленных на *Manduca sexta*, было обнаружено, что образование этого комплекса (МГК) в ЦНС обязано рецептивным волокнам, посылаемым в центр трихоидными сенсиллами. Шнейдерман (Schneiderman) с сотрудниками трансплантировали антеннальные и магинальные диски самцов в головы личинок самок вместо одного из ее собственных антеннальных имагинальных дисков перед окукливанием. Подопытные животные были гинандроморфами, при этом в антеннах, развившихся из трансплантата, дифференцировались трихоидные сенсиллы. В соответствии с этим в области мозга самок, куда они проецировались, возникал не свойственный самке макрогломерулярный комплекс, и в поведении таких самок проявлялись "самцовые" черты – они реагировали на запах самки и подобно самцам летели в направлении источника запахов. По всей вероятности, морфогенетические процессы, протекающие в ткани мозга, в определенной степени зависят от функционирования генетической системы,

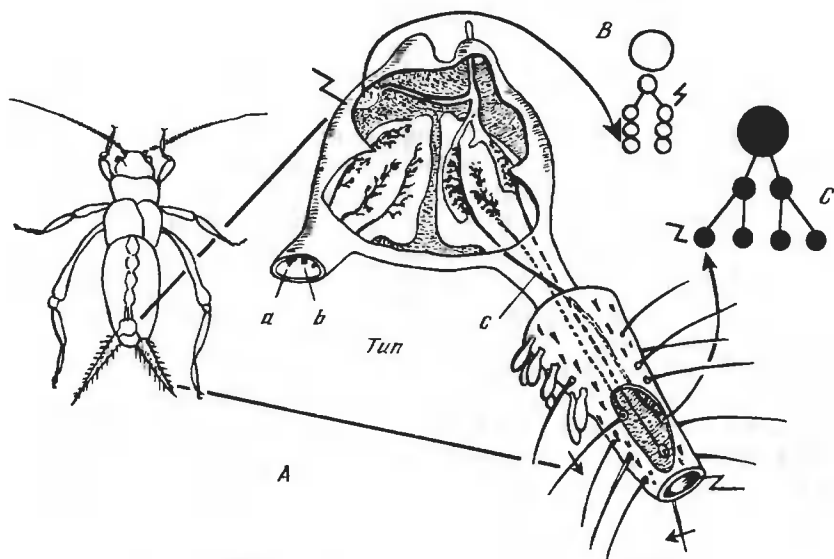


Рис. 7.17. Система – церки – гигантские интернейроны у сверчка.

A – основной принцип организации этой системы. 1 – тела сенсорных нейронов локализованы на периферии тела. 2 – сенсорные нейроны разной локализации в церках процидурются в разные области абдоминального ганглия. 3 – дендриты постсинаптических клеток распределены в определенной области – мишени и контактируют с определенными, специфическими видами других сенсорных клеток. B – природа центральных нейронов. представленных на рис. A. В ходе эмбриональной жизни нейробласты (30 пар нейробластов на ганглии) проходят серию асимметричных делений, которые ведут к образованию 20–100 нейронов на каждый нейробласт. Все нейробласты гибнут к моменту вылупления животных, так что формирование конечного паттерна нейронов завершается к вылуплению. C – природа сенсорных рецепторов. Каждый рецепторный комплекс формируется одной эпидермальной клеткой, удлиняющейся и претерпевающей два раунда делений. Каждая из четырех образованных клеток имеет специальную функцию, одна формирует внешний волосок, другая – муфту, третья – сенсорный нейрон, четвертый – покровную клетку. По Murphy et al., 1981.

которая детерминирует образование специфических рецепторных зон на периферии. У *Drosophila melanogaster* эта система активно изучается. Она представлена кластером генов, локализованных в X-хромосоме.

Методы трансплантации использованы и в изучении других случаев взаимоотношений центра и периферии у насекомых. Пока что отнюдь не дрозофила используется в соответствующих экспериментах, а те насекомые, на которых удобно проводить трансплантации различных участков эпидермиса, содержащие рецептивные зоны. Это прежде всего сверчок *Acheta domestica*. Одна из модельных систем – рецептивные поля на церках, длинных тонких хвостовых нитях, суживающихся к концу и состоящих из большого числа члеников (рис. 7.17). Такое строение делает их похожими на антенны, но они чаще подвергаются редукции. У таракана они укорочены, хотя и со-

храняют расчленение, у ухвертки исчезают и расчленения, у большинства *Holometabola* церки отсутствуют, лишь самки панорпы имеют придатки, соответствующие церкам. Функционально церки являются органами чувств и играют выдающуюся роль в оценке аэродинамической ситуации: чувствительные волоски и расположенные под ними сенсорные клетки образуют продольные ряды, каждый из которых реагирует на какое-то одно определенное направление движения воздуха. Совокупность нейронов, организованных в такие ряды, способна, таким образом, получить полную информацию о направлении ветра и прочих его характеристиках. Гигантские интернейроны ЦНС строго специфическим способом получают синапсы от определенного набора афферентов. Иными словами, проекция сенсорных волокон в ЦНС строго упорядоченна. Все нейроны одного продольного ряда проецируются приблизительно в то же самое поле центральной нервной системы, в то время как отростки нейронов соседнего продольного рецептивного поля проецируются в соседнее поле ЦНС. Это важный принцип функционального кластерирования сенсорных нейронов в продольные ряды (направляется аналогия с модулями позвоночных). Это означает, что направление ветра кодируется в различных локальных полях нейропиля.

Таким образом, интернейрон с дендритными разветвлениями в одном поле нейропиля будет получать направленную информацию о “течениях” воздуха от клеток определенного сенсорного ряда. Синаптические связи с конкретным интернейроном устанавливают те сенсорные волокна, которые пересекают его дендритное поле. Следовательно, специфически детерминированный нейронный контур складывается в результате взаимодействия двух систем – рецепторной с ее проецирующимися в ЦНС афферентами и дендритных полей интернейронов центральной нервной системы, являющихся мишенью для этих афферентов. Что же направляет отростки сенсорных нейронов точно к их мишеням в ходе онтогенеза? Есть предположение о наличии специфического химического градиента, создающего “chemoaffinity” в росте нервных волокон и формировании паттерна их связей, так что сенсорные нейроны как бы снабжаются биохимическими этикетками, которые соответствуют их положению в рецептивном поле. Эта гипотеза оживляет взгляды Рамон-и-Кахалья, и на ее основе предполагается, что в растущем эпидермисе насекомых существует генетически детерминированный монотонный градиент, который может быть прочитан созревающими нервными клетками, так что их дифференцировка направляется этим градиентом (а он в таком случае составляет суть так называемой позиционной информации). Если предложенная гипотеза правильна, поведение нейрона в развитии определяется его позицией, и изменение этой позиции должно повлечь за собой изменения фенотипической его характеристики. У некоторых насекомых такое “перемещение” нейрона как во “взрослом”, так и в “незрелом” состоянии легко осуществить – как в пределах одного индивида, так и между индивидами и даже между индивидами разных видов.

Группа Мэрфи (Murphey) в США провела соответствующие эксперименты на сверчке *Acheta domestica*. Маленькие кусочки эпидермиса, содержащие группу идентичных сенсорных нейронов, были трансплантированы от черного к рыжевато-коричневому сверчку (это разные виды, но их сенсорные системы идентичны). Таким образом, черная ткань была маркером трансплантата, и соответственно новый эпидермис и рецепторные элементы донора были хорошо заметны среди тканей хозяина по их темной пигментации. Оказалось, что: 1) трансплантированные нейроны нормально регенерируют, 2) при трансплантации ткани в гомологичную позицию отростки нейронов донора разветвляются в поле той же мишени, что и отростки соответствующих нейронов хозяина, 3) отростки нейронов, трансплантированных в эктопическую область, растут в хозяйскую ЦНС и находят свою “естественную мишень”, где и ветвятся. Следовательно, они “помнят” их “донорский” фенотип и “воспроизводят” его в организме реципиента. Это еще один механизм “осуществления” генетической регуляции поведения через контроль организации ЦНС в процессе онтогенеза.

Но определяется ли распределение афферентов в паттерне нейрального контура целиком и полностью реализацией собственной генетической программы афферента? Оказывает, нет. Дело в том, что на границе трансплантата и хозяйской ткани индуцируются пролиферативные процессы. И вот сенсорные нейроны, возникающие в этой новой ткани, образуют отростки промежуточного фенотипа. Интерпретация этого факта – единственная: дифференцирующийся нейрон в ходе своего развития получает направляющий это развитие сигнал. Данный сигнал есть функция положения клетки-предшественника во время терминального митоза. Напротив, зрелый нейрон неспособен ответить на новый сигнал “chemoaffinity” в случае его перемещения, так что судьба его в этом случае не изменяется.

Однако генетически детерминированное формирование синaptических связей и соответственно поведенческих реакций не принадлежит к числу событий “все или ничего”. Ведь сенсорные клетки должны не только локализовать соответствующую область мишени, на которой надлежит “замкнуть” нервную связь, но и найти правильный интернейрон и обеспечить паттерн нейрального контура: каждый билатеральный сенсорный нейрон обязан обеспечить ипсилатеральный регион ЦНС и, если это записано в его генетической программе, определенную контрлатеральную область. Оказывается, нарушение сбалансированной системы онтогенеза приносит существенный шум в реализацию программы нейрогенеза. Так, удаление одной церки в ранний постэмбриональный период детерминирует выраженное преобразование терминалей оставшегося “целым” билатерального сенсорного нейрона. Они “сдвигаются” на деафферентированную сторону. Удаление одной церки как бы “снимает”, следовательно, сбалансированную конкуренцию билатеральных нейронов за мишени, в норме разрешаемую билатеральностью же, двойственностью мишени, в результате чего проявляются скрытые

морфогенетические потенции сенсорных нейронов, программируемые собственной генетической системой, но “сдерживаемые” благодаря реализации генетической программой интернейронов-мишеней. Каждый нейрон, таким образом, может осуществлять и поддерживать паттерн ветвления аксонов в определенных максимальных границах, и это – внутреннее свойство нейронов.

В то же время следует указать на то, что билатеральные сенсорные нейроны никогда не проявляют экспансионизма относительно “чужих” сфер “влияния” в нейропиле, даже если они будут экспериментально лишены собственных афферентных связей. Это свидетельствует против различных базирующихся на стохастических принципах гипотез нейрогенеза и подтверждает достаточно жесткий детерминизм и специфичность в становлении паттерна нервных связей.

Гинандроморфов дрозофилы использовали для локализации центров полового поведения в ЦНС мухи. Для получения гинандроморфов использовали то обстоятельство, что в линии дрозофилы с одной из X-хромосом, замкнутой в кольцо (кольцевая хромосома), эта хромосома при делении оплодотворенного ядра в одном из ядер элиминируется, в другом – сохраняется, так что образуется гинандроморф с женскими (XX) и мужским (XO) тканями. X-хромосому можно пометить, например, геном, кодирующим какой-нибудь фермент и мутировавшим так, что его продукт утрачивает ферментативную активность, а кольцевая хромосома содержит нормальный аллель этого гена. В таком случае мужскую ткань в гинандроморфе можно найти по отсутствию гистохимической окраски на данный фермент на гистологическом срезе. В связи с тем, что XX- и XO-ядра мигрируют у разных эмбрионов по-разному, получается набор гинандроморфов с разной локализацией мужской и женской ткани, так что мужское или женское поведение можно соотносить с разной локализацией соответствующих тканей у гинандроморфа. Существуют разные методы индуцирования соматической утраты одной из X-хромосом в части клеток дипло (XX) зиготы, помечая мужскую ткань сходным методом, но с использованием разных хромосом, так что можно было, например, помечать мужскую ткань активностью кислой фосфатазы.

С помощью таких гинандроморфов разные стадии полового поведения самцов были “привязаны” к определенным зонам ЦНС. Например, расправление крыльев и лизание – к дорзальному мозгу, песню ухаживания, попытки копуляции – к различным частям торакального ганглия. При использовании мозаиков дрозофилы и метода Бензера удалось локализовать фокусы, ответственные за яйцекладку и высвобождение спермы – в торакальном ганглии. Однако место в пробирке, куда самка дрозофилы будет откладывать яйца, контролируется определенной зоной головного мозга. Половое поведение дрозофилы не зависит от наличия или отсутствия яичников или клеток зародышевого пути, но только от особенностей организации нервной системы.

Использование метода трансплантации для изучения некоторых форм патологического поведения

Химерных животных используют для изучения некоторых форм патологии, отражающейся на поведении животных и человека. В частности, удалось с помощью ксенотрансплантации разработать экспериментальную модель такой болезни, как рассеянный склероз (multiple sclerosis). В лаборатории французской исследовательницы Николь Ле-Дуарен (LeDouarin) трансплантировали фрагменты нейральной закладки спинного мозга эмбрионов куропатки (quail) в соответствующий отдел спинного мозга эмбрионов цыпленка 2 дней инкубации. Вылупившиеся птицы демонстрировали нормальное двигательное поведение до 5–7-недельного возраста. Затем развивался патологический синдром, который выражался в нарушении движения и в развитии в зоне трансплантата бляшек, подобных склеротическим. Наблюдали, также своиственные рассеянному склерозу энцефаломиелит и неврит, нарушение проницаемости гемато-энцефалического барьера (blood-brain barrier), инфильтрацию лейкоцитами нервной ткани и демиелинизацию нервных волокон.

С помощью трансплантаций эмбриональной нервной ткани можно индуцировать или, напротив, ингибировать эпилептические припадки различной этиологии у млекопитающих.

Наконец, трансплантации эмбриональной нервной ткани используются при лечении некоторых неврологических заболеваний, в частности, нарушающих нормальное движение. Например, при наследственной болезни Паркинсона, вызываемой недостаточностью дофаминэргической системы, трансплантируют эмбриональные дофаминэргические нейроны, чтобы как-то восполнить имеющийся дефект. Трансплантацию эмбриональной нервной ткани используют также при лечении болезни Альцгеймера (старческая деменция), хореи Гентингтона и ряда других неврологических заболеваний.

Доместикация и рассудочная деятельность

Люди с древних времени обращали внимание на поведение животных и старались приручить тех из них, которые были полезны в хозяйстве. Это приручение получило название одомашнивания, или **доместикации**. То, что одни животные поддавались приручению, а других (например, львы, тигры, гиены) невозможно было приручить, свидетельствует о наследственной предрасположенности некоторых животных к служению человеку. Однако генетическая природа этих способностей долгое время не исследовалась, по крайней мере до той поры, пока российскому генетику Д.К. Беляеву не довелось найти очень удобную для этой цели экспериментальную модель.

Д.К. Беляев вместе со своей сотрудницей Л.Н. Трут селекционировал лисиц на агрессивность и спокойное поведение. Оказалось, что среди дикой популяции лисиц наблюдается выраженное разнообразие по



Л.В. Крушинский и Д.К. Беляев – основоположники генетики поведения в России. Создали отечественную школу генетики поведения, вырастили многочисленных учеников, продолжающих их исследования в России и за рубежом.

их реакции на появление человека: некоторые животные обнаруживают злобное поведение, а другие демонстрируют вполне дружественную реакцию. Так, в популяции лисиц одного из сибирских хозяйств было обнаружено 30% животных, проявляющих агрессию на человека различной степени выраженности, 20% – страх, большинство животных (40%) – злобно-трусливую реакцию, и, наконец, 10% не проявляли в присутствии человека оборонительной реакции. Эти поведенческие реакции являются одним из компонентов сложной генетически детерминированной системы регуляции функции размножения. Животные без агрессивной реакции на человека, характеризующиеся спокойным поведением, обнаруживают более ранние сроки спаривания в сезоне размножения и более высокую плодовитость по сравнению с остальными. Наследственный характер поведенческого полиморфизма, наряду с этими обстоятельствами, послужил основой для начала селекционного эксперимента на доместикационные эффекты поведения. Опыты по доместикации лисиц продолжаются уже более 30 лет. За это время была выведена популяция доместичированных животных, причем степень одомашненности у разных представителей экспериментальной популяции значительно варьирует, и поведение отдельных животных приближается к поведению собаки (рис. 7.18).

Доместикация лисиц оказала глубокое влияние на многие морфофункциональные системы, в частности, на воспроизводительную систему и на поведение, связанное с особенностями ее функционирования. Особенно характерным является тенденция к сдвигу начала сезона раз-



Рис. 7.18. Д.К. Беляев с одомашненными лисицами.

множения на более ранние сроки (декабрь вместо января), и возникновение дизэстричности у животных, которым в норме свойственна моноэстричность, а также попытки повторного спаривания в конце марта—начале апреля. Факт повторного спаривания свидетельствует о том, что наследственная реорганизация дикого поведения лисиц в сторону домашнего вызывает эволюционную ломку сезонного характера размножения и возникновение дизэстричности у животных, которым в норме свойственна моноэстричность.

Существен также факт возникновения новых форм поведения у одомашнированных лисиц. Некоторые особи обнаруживают поведение, которое напоминает собачий рефлекс охраны человека, при его появлении в загоне, где содержится группа животных с определенными, сложившимися в ней отношениями доминирования—подчинения, такие лисицы как бы охраняют человека, не подпуская к нему других животных. Подобных явлений не наблюдается в неселекционированной популяции животных. Отмечены также некоторые изменения голосовых реакций у одомашниваемых животных: иногда они рычат по-собачьи, а издаваемые ими звуки напоминают собачий лай.

Поведенческие изменения протекают у одомашниваемых лисиц на фоне гормональных сдвигов и определенных преобразований в нейро-

медиаторной системе. Гормональные сдвиги лежат в основе изменений поведения, связанного с воспроизводительной функцией. В частности, существенным последствием доместикации является изменение реактивности коры надпочечников к различного рода внешним воздействиям. Известно, в частности, что внешние воздействия опосредуются через АКТГ (адренокортикотропный гормон), чувствительность к которому у селекционированных по поведению лисиц осенью (сентябрь-октябрь) выше, чем у не селекционированных. Как оказалось, доместикация вообще изменяет функциональную активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, и эти изменения сопровождаются изменениями функционального состояния половых желез. Различия между дикими и доместичированными животными в этом отношении складываются уже в ходе пренатального онтогенеза. Так, в конце этого периода содержание кортизола в надпочечниках, а также его продукция *in vitro* были достоверно ниже у эмбрионов от селекционируемых матерей по сравнению с неселекционированным контролем. Добавление АКТГ к инкубационной среде увеличивало синтез кортизола во все изученные периоды онтогенеза, однако в меньшей степени у селекционируемых животных, чем у контрольных. В конце пренатального периода (45–50 суток) содержание прогестерона в надпочечниках также было достоверно ниже у эмбрионов от селекционируемых матерей, чем у контрольных животных. Можно заключить, что в основе доместикационного преобразования гормональной функции гонад и надпочечников у серебристо-черных лисиц лежат наследственные изменения их онтогенетического формирования. В целом же из изложенных данных следует, что искусственный отбор на доместикационное поведение сопровождается коррелятивным снижением стероидогенеза в надпочечниках и усилением реактивности семенников к действию стимулятора стероидогенеза в период пренатального развития. В связи с тем, что лисицы не являются удобным объектом для биохимических исследований, эксперименты по одомашниванию были повторены на серых диких крысах, так что удалось отселекционировать ручных крыс, существенно отличавшихся по своему поведению от своих диких и агрессивных сородичей. Данные по сравнению гормонального баланса у обеих групп животных согласуются с результатами исследований, проведенных на лисицах. В частности, у ручных крыс уровень кортикостерона в надпочечниках снижен почти в 2 раза по сравнению с агрессивными крысами (рис. 7.19).

У ручных крыс изменена и чувствительность надпочечников к АКТГ. У агрессивных – достоверное повышение уровня кортикостерона в крови наблюдается только на дозу 2 ед. АКТГ, в то время как у ручных животных это повышение наблюдается уже при дозе 1 ед. АКТГ. У ручных крыс по сравнению с агрессивными наблюдается изменение динамики реакции на стресс, а также более быстрое восстановление базального уровня кортикостерона после стресса, что связано с повышением чувствительности отрицательной обратной связи гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой стрессорной системы. Известно, что глюкокортикоидные рецепторы мозга играют важную роль в системе отрицательной обратной связи стрессорной системы, являясь мишенью для

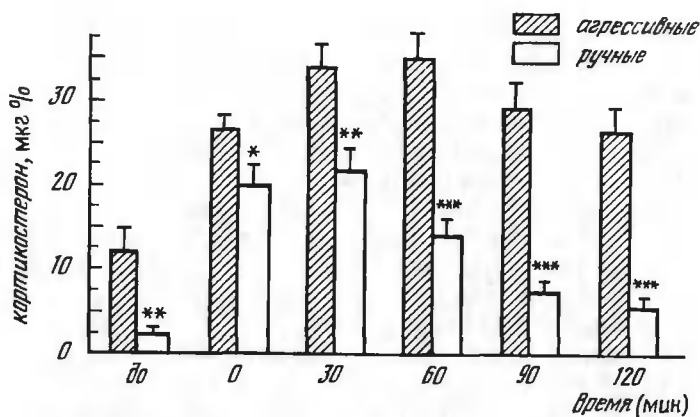


Рис. 7.19. Уровень кортикостерона у ручных и агрессивных крыс до стресса, после 20-мин. иммобилизации (0) и через разные временные интервалы после прекращения воздействия.

обратного действия глюкокортикоидов. Сравнительный анализ количества глюкокортикоидных рецепторов в различных отделах головного мозга (гиппокамп, гипоталамус, миндалина, гипофиз) показал, что число цитозольных глюкокортикоидных рецепторов увеличивается более чем в полтора раза у ручных крыс по сравнению с агрессивными животными только в гиппокампе. Следовательно, при отборе серых крыс на доместикационное поведение наблюдаются изменения различных звеньев гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. При этом совершенно очевидно, что глюкокортикоидные рецепторы гиппокампа также играют важную роль в процессе доместикации.

Установлено также, что отбор на низкую агрессивность и дружелюбное по отношению к человеку поведение существенно отражается на функциональной активности медиаторных систем мозга, регулирующих тот тип поведения, по которому ведется селекция. Заметно при этом, что характер изменений идентичен у серебристо-черных лисиц и диких серых крыс. Эти изменения в первую очередь касаются метаболизма ингибирующего агрессивное поведение серотонина и участвующие в регуляции эмоций катехоламинов норадреналина и дофамина. К таковым относятся моноаминоксидаза (МАО) и триптофангидроксилаза. О роли МАО свидетельствует повышение содержания 5-гидроксииндолуксусной кислоты в полосатом теле (стриатум) у ручных норок и в гипоталамусе у доместичированных серых пасюков. У доместичированных лисиц и у ручных норок была найдена пониженная активность А и Б типов МАО в стволе мозга по сравнению с неселекционированными животными. Эти данные хорошо согласуются с результатами исследований метаболизма серотонина. В этом случае наблюдается повышение активности триптофангидроксилазы, которая не только высокоспецифичный для серотонина фермент, лимитирующий скорость его

синтеза, но и является маркером функциональной активности серотонинэргической системы мозга.

Изменения в нейромедиаторных системах мозга при доместикации не ограничиваются серотониновой системой. Выявлены также изменения метаболизма норадреналина и дофамина. Поскольку обе медиаторные системы сходно изменяются при селекции на поведение у представителей разных отрядов, можно предполагать, что подобные сдвиги представляют собой существенную часть механизмов превращения дикого агрессивного животного в особь, не проявляющую агрессивной реакции на человека.

Под жесткое давление искусственного отбора при селекции по поведению попадают различные звенья медиаторной системы, и измененным оказывается не только ее метаболизм, но и рецепторные системы медиаторов. В частности, были найдены сдвиги в плотности серотониновых рецепторов типа 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A}, а также в чувствительности дофаминовых D₂ рецепторов у крыс пасюков, селекционированных на низкую агрессивность по отношению к человеку.

Изменения в метаболизме медиаторов, которые наблюдаются при селекции по поведению, специфичны для того вида поведения, по которому проводится селекция. Так, были обнаружены существенные сдвиги в серотонинэргической и дофаминэргической системах мозга при селекции на другой вид защитного поведения – замирание (каталепсия), однако их характер был другим.

Реакция замирания, так же как и агрессия на человека, представляет собой поведение, вызванное страхом, и принадлежит к трем основным типам защитного поведения (бегство, замирание, агрессия). Исследованиями серотонинэргической системы мозга у различных видов животных, генетически предрасположенных к каталепсии, установлено, что у крыс, селекционированных в течение 30 поколений на предрасположенность к каталепсии, активность триптофангидроксилазы повышена в стриатуме, но не в других структурах мозга. Сходное повышение активности ключевого фермента синтеза серотонина в стриатуме было выявлено у мышей линии СВА, которые отличаются от мышей других линий высокой предрасположенностью к развитию реакции замирания. Это, в общем, и понятно, поскольку именно стриатум является одной из структур мозга, регулирующих мышечный тонус, и именно он контролирует развитие каталепсии. Было обнаружено, что эти изменения в активности триптофангидроксилазы в стриатуме играют главную роль в экспрессии генетической предрасположенности к каталепсии, поскольку введение ингибиторов этого фермента предотвращало возникновение каталепсии как у крыс, так и у мышей. При этом изменения в серотониновых рецепторах 5-HT_{1F} типа оказались сходными у крыс, генетически предрасположенных к разным видам защитного поведения, в частности реагирующих замиранием и высоко агрессивным поведением. Поскольку этот тип рецепторов включен в функционирование механизма тревожности и депрессии, триггером всех видов защитного поведения является страх. В целом можно заключить, что наследование защитного поведения вне зависимости от его вида определяется генети-

чески детерминированным пониженным числом 5-HT_{1A} рецепторов во фронтальной коре головного мозга, тогда как конкретный вариант реализации этого поведения зависит от так же генетически детерминированных региональных особенностей метаболизма дофамина в определенных структурах мозга. Важно отметить, что все эти особенности формируются в процессе онтогенеза, задавая нервной системе те специфические черты ее организации у животных различных линий, от которых в последующем зависят специфические в каждом случае черты структурно-химической организации мозга и обусловленные этой организацией специфические особенности поведения.

В процессе общения с domestцированными животными было замечено, что порой их поведение очень напоминает разумное, как будто им присуща **рассудочная** деятельность и понимание окружающей ситуации. Об этом виде деятельности животных еще в 30-е годы высказывался В. Келер, изучавший человекообразных обезьян и утверждавший, что они способны принимать настоящие решения, которые не требуют предварительного индивидуального опыта. Основным критерием разумного поведения является решение задачи с учетом всей ситуации в целом. Поэтому возникновение такого рода решений является согласно Келеру признаком разумного поведения. Е. Рассел (E. Russel) в те же годы рассуждал о способности животных действовать не только методом проб и ошибок, но и путем принятия решения к осуществлению какого-либо поведенческого акта до его выполнения. На наличие у животных специфического типа поведения, в основе которого лежит рассудок или понимание, указывали Дж. Конорский (Konorski), Дж. Биренс де Хаан (Bierens de Naan), В. Торп (Торп) и др.

Российский генетик Л.В. Крушинский обнаружил своеобразный вид поведения животных, позволивший исследовать их способность к рассудочной деятельности экспериментально. Он назвал этот вид поведения **экстраполяционным**. Суть его заключается в том, что животное реагирует не только на какой-либо непосредственный раздражитель, но и на то направление, по которому перемещается этот раздражитель при его закономерном движении (рис. 7.20).

Способность к экстраполяции, осуществляющейся на основе быстро образующихся ассоциаций между явлениями внешнего мира, является одним из важнейших критериев рассудочной деятельности. Л.В. Крушинский избрал для своих экспериментов различных животных – млекопитающих и птиц. В частности, удобными объектами оказались птицы и кролики. В качестве пищевого раздражителя использовали хлеб, мясо, яйца, пшено – в зависимости от вида используемых животных. Опыты проводились в лаборатории, и во время опытов животные имели возможность свободно передвигаться по всему помещению. Схема опытов была следующей. Пищевой раздражитель двигался прямолинейно с постоянной скоростью. Первоначальный отрезок пути его движения проходит на виду у животного, которое при этом имеет возможность не только видеть, но и подкармливаться от пищевого раздражителя. Продвинувшись определенный отрезок пути на виду у животного, раздражитель скрывается

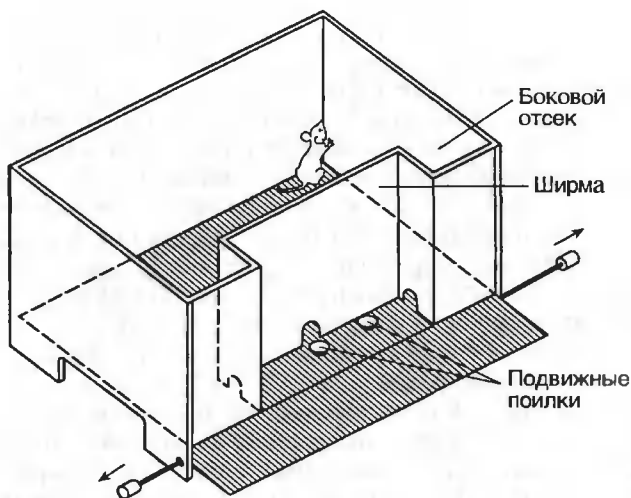


Рис. 7.20. Установка Крушинского для изучения экстраполяционного поведения животных.

за укрытие. В эксперименте выяснялось, продолжают ли животные поиск пищевого раздражителя после того, как они перестают воспринимать его своим рецепторным аппаратом, и способны ли они экстраполировать направление его движения. В ходе экспериментов был обнаружен парадоксальный факт – отсутствие неперменной связи между степенью развития элементарной рассудочной деятельности животных и уровнем развития новой коры. Оказалось, что птицы из семейства вороновых по своей способности к решению задач по экстраполяции находятся на уровне хищных млекопитающих. Этот факт был неожиданным, потому что у птиц отсутствует новая кора, с которой многие исследователи связывают высшие психические функции. В процессе филогенеза у птиц вместо новой коры развивается стриатум (полосатое тело). Характерно, что именно у вороновых полушария достигли большого объема по сравнению с другими птицами за счет мощно развитых ядер полосатого тела.

У млекопитающих также удастся установить зависимость между степенью развития рассудочной деятельности и относительным размером мозга: приматы и дельфины обладают наиболее дифференцированным и большим мозгом среди млекопитающих. Можно утверждать, что степень цефализации в пределах каждого класса позвоночных животных представляет собой важнейший параметр, определяющий уровень развития рассудочной деятельности. Чем выше степень цефализации у того или другого вида животных, тем больше вероятность значительного развития их рассудочной деятельности. Важное значение для уровня рассудочной деятельности имеет также степень развития ассоциативных зон головного мозга, в особенности лобных долей. Сущест-

венно при этом усложнение системы межнейронных контактов, сопровождающееся повышением уровня рассудочной деятельности.

Нейроморфологические исследования демонстрируют, что в филогенетическом ряду позвоночных наряду с увеличением разнообразия в нейронном строении мозга усложняется также и система синаптических взаимосвязей между нейронами. В ряду млекопитающих наблюдается, в частности, параллелизм между уровнем развития рассудочной деятельности, степенью дифференцированности форм тел пирамидных клеток и протяженностью их дендритных разветвлений. В сравнительно-анатомическом ряду млекопитающих наблюдается также увеличение степени дифференцированности звездчатых нейронов, функция которых заключается в интеграции функциональной деятельности определенных групп эфферентных нейронов.

У птиц важная роль в высших отделах мозга принадлежит так называемому Wulst. Эта структура состоит из hyperstriatum accessorium, hyperstriatum dorsale, nucleus intercalatus hyperstriati и покрыта тонким кортикоидным слоем, формируя заметное возвышение. Ариенс Капперс (Kappers) полагал, что Wulst по своим связям и функциям близок к неопаллиуму низших млекопитающих, являясь как бы заменителем новой коры. Показано, что Wulst закладывается в развитии не как базальный ганглий, а как паллиальное утолщение, т.е. имеет общее происхождение с некоторыми отделами новой коры млекопитающих. Считается, что Wulst и стриарная область коры имеют общее эмбриогенетическое происхождение, одинаковые связи с другими структурами, одинаковую функцию и определенное сходство в строении, а это отвечает определению гомологичных органов.

Предполагается, что именно генетически детерминированная сложность организации создает возможность стриарным отделам переднего мозга птиц осуществлять очень сложные функции, включая рассудочную деятельность. В пользу этого свидетельствуют данные сравнительного анализа нейронного состава переднего мозга птиц с различной способностью к решению элементарных логических задач на основе экстраполяционной рассудочной деятельности, а именно у голубей, характеризующихся крайне низкой способностью к рассудочной деятельности, и ворон, напротив, отличающихся высоким уровнем развития в этом отношении. Оказалось, что при наличии общих главных групп нервных клеток наблюдается большая сложность строения нейронов у ворон по сравнению с соответствующими клетками голубей. Например, дендритные стволы нейронов ворон более извитые, более тонкие, а у большинства клеток с коротким аксоном они еще и четкообразные. У голубей во всех группах клеток дендриты более грубые и прямые (рис.7.21). Среди нейронов с длинным аксоном у ворон выделяются отдельные клетки, дендриты которых усеяны густым покровом шипиков. В стриатуме голубей подобных клеток не обнаружено. Наоборот, в стриарных отделах мозга голубей встречаются нервные клетки, как длинно-, так и короткоаксонные упрощенной организации. Они имеют толстые, грубые дендриты с редкими крупными палочкообразными шипиками. В стриатуме ворон такие клетки обнаружены не были.

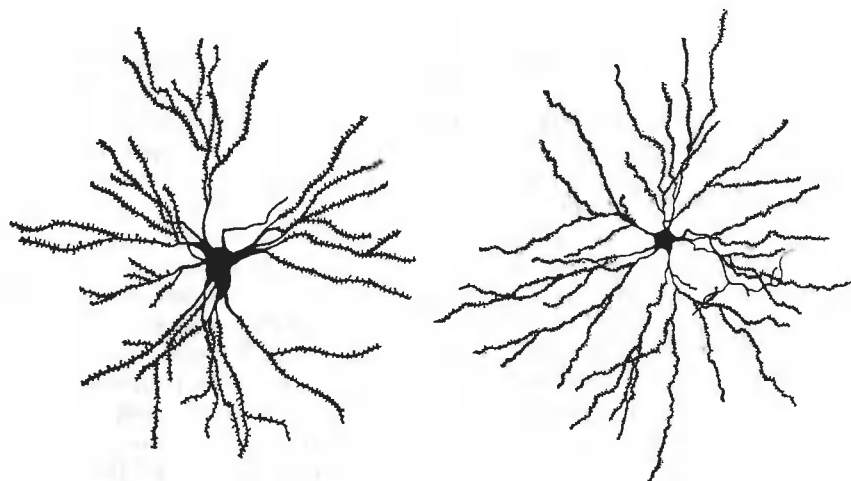


Рис. 7.21. Длинноаксонные нейроны из неостриатума птиц: вороны (справа) и голубей (слева). По Доброхотовой.

Совершенно очевидно, что различия в тонком строении нейронов переднего мозга птиц отражают большее совершенство строения нервных клеток у ворон и создают морфологические предпосылки для более тонкого анализа и переработки поступающей в мозг информации.

Электрофизиологический анализ также выявил видовые особенности и в функциональных характеристиках нейронов голубей и ворон. Для *hyperstriatum accessorium* ворон характерно большее число реагирующих нейронов, чем для голубей. При этом у ворон преобладают нейроны с полисенсорными свойствами и большим диапазоном предпочтительных направлений движения раздражителя.

В целом было показано, что способности к элементарной рассудочной деятельности относительно слабо развиты у голубей и кур и достигают у вороновых более высокой степени развития. Морфофизиологической основой этих различий являются особенности строения *Wulst* у птиц. Корковые структуры птиц едва ли задействованы в этом процессе, поскольку у этих животных они значительно редуцированы даже по сравнению с корой рептилий. Напротив, у млекопитающих степень развитости корковых структур имеет существенное значение для успешного осуществления рассудочной деятельности, так же как и относительный размер мозга, количество и многообразие межнейронных контактов: чем больше количество нервных клеток и чем сложнее система межнейронных контактов, тем выше уровень рассудочной деятельности.

Непосредственное отношение к осуществлению элементарного рассудочного акта имеют определенные структуры переднего мозга, у наземных млекопитающих в особенности префронтальный отдел моз-

га. Связь уровня рассудочной деятельности с этим отделом несомненна: чем сильнее развита эта структура, тем выше уровень рассудочной деятельности.

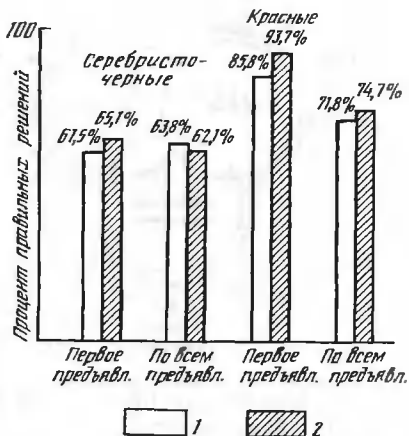
Исследовать **генетические** основы рассудочной деятельности не так просто. Тем не менее некоторые данные в этом направлении были получены. Так, оказалось, что четыре породы охотничьих собак (спаниели, фокстерьеры, басенджи и бигли) имеют несколько более высокие показатели в решении предъявляемых задач, чем шотландские овчарки. Одним из удобных объектов исследования являются крысы и мыши. Интересные результаты получили при использовании мышей с робертсоновскими транслокациями разного происхождения. Часть мышей имела в кариотипе транслокацию, названную Е1ИЭМ, часть – робертсоновские транслокации, перенесенные путем скрещиваний в кариотип линейных мышей из генотипа так называемых табачных мышей (*Mus poschiavinus*) дикой популяции, имеющей семь пар хромосом с робертсоновскими транслокациями. Мыши с робертсоновскими транслокациями характеризуются некоторым преобладанием доли правильных решений экстраполяционных задач над неправильными, и в этом отношении они сходны с дикими мышами и гетерогенной популяцией. Эти данные свидетельствуют о том, что изучаемая форма поведения мышей разных групп находится под контролем генотипа.

Для лабораторных линий крыс характерны либо слабовыраженная способность, либо неспособность к экстраполяции. Зато дикие крысы (пасюки) продемонстрировали высокие показатели решения экстраполяционных задач. Скрещивание диких и лабораторных крыс и тестирование гибридного потомства на решение экстраполяционных задач позволили прийти к следующим заключениям: 1) уровень развития элементарной рассудочной деятельности у крыс контролируется генотипическими факторами; 2) исследованные линии лабораторных крыс и их гибриды обладают менее развитой элементарной рассудочной деятельностью, чем дикая форма *Rattus norvegicus*. Возможно, одним из факторов, способствующих наиболее яркому выражению элементарной рассудочной деятельности у диких крыс, является наследственно свойственная им повышенная возбудимость. Это, однако, едва ли является единственным обстоятельством, определяющим столь выраженные различия. Генотип лабораторных domesticированных крыс можно рассматривать как **дезинтегрированную** генетическую систему *Rattus norvegicus*, глубоко изменившую ряд морфофизиологических особенностей дикой серой крысы.

Исследованы на предмет рассудочной деятельности и одомашненные серебристо-черные лисицы, отселектированные Д.К. Беляевым. Их поведение сравнивали с поведением диких красных лисиц. На рис. 7.22 представлены результаты сравнения успеха в решении экстраполяционных задач серебристо-черными и красными лисицами. Во всех группах серебристо-черных лисиц количество правильных решений превалирует над ошибочными, однако ни одна из этих групп не достигает по успеху решения красных лисиц. В целом пока-

Рис. 7.22. Гистограмма успеха решения экстраполяционной задачи разными группами лисиц:

1 – свободное содержание, 2 – клеточное содержание. По Крушинскому и др.



зано, что серебристо-черные и красные лисицы решают экстраполяционные задачи разных степеней усложнения. Выявлено значительное преимущество красных лисиц над всеми группами серебристо-черных лисиц. Различия проявились как в успехе решения экстраполяционной

задачи, так и в выборе наиболее адекватной тактики нахождения приманки, исчезающей из поля зрения животного. Вероятно, эти различия обусловлены генетическими механизмами, поскольку исследованные красные лисицы были добыты из нор щенятами и не имели возможности ознакомиться с многообразием среды обитания диких лисиц. Предполагается существование полигенной системы, обеспечивающей высокоразвитую рассудочную деятельность диких лисиц, которая в результате уменьшения давления естественного отбора постепенно распадается. В основе этого распада у одомашненных животных лежат постоянно идущий мутационный процесс, рекомбинация генов, селекция по специфическим признакам. Все это приводит к дезинтеграции генотипа, обуславливающего адекватное поведение лисиц в естественных условиях их существования. Сходные изменения рассудочной деятельности наблюдались и у ручных крыс.

Таким образом, при domestикации, когда животные попадают в необычные условия обитания, происходит перестройка всего генотипа в целом в каждой популяции одомашниваемых животных. Морфофизиологическим выражением этих событий и соответственно эволюции полигенных систем являются те различия в поведении, функциональной активности эндокринных и нейромедиаторных систем, окраске шерсти и многих других признаках, по которым domestцированные животные отличаются от своих диких предков.

Согласно представлениям Д.К. Беляева и Л.В. Крушинского, дикие формы животных можно рассматривать как обладающих **интегрированной системой генов**, которые обуславливают наиболее адекватные формы приспособления к среде обитания. У диких животных посредством повышения уровня их элементарной рассудочной деятельности возникают наиболее приспособленные к условиям существования формы поведения. Поэтому естественно, что обратный процесс дезинтеграции сбалансированных генотипов в ходе domestикации животных приводит к понижению уровня рассудочной деятельности. На рис. 7.23 представ-



Рис. 7.23. Схема взаимоотношения основных элементарных компонентов поведения. По Крушинскому.

лена схема Л.В. Крушинского, отражающая взаимоотношения основных компонентов, которые принимают участие в формировании поведенческого акта. В процессе филогенеза происходит существенное перераспределение удельного веса инстинктов, обучаемости и рассудочной деятельности. Очевидно, что на ранних этапах филогенетического развития ведущее значение в формировании поведения играют инстинкты. По мере усложнения организации нервной системы кроме инстинктов большую роль в адаптивном поведении начинают играть различные формы обучения. Дальнейшая дифференциация конечного мозга приводит к тому, что элементарная рассудочная деятельность становится все более значимой в поведении животных. Наконец, у человека рассудочная деятельность оказывается основным компонентом, определяющим его поведение.

ЛИТЕРАТУРА

- Александрова М.А., Полежаев Л.В. Ксенотрансплантация мозга у лягушек // Докл. АН СССР. 1984. Т. 274. С. 711–715.
- Бензер С. Генетический анализ поведения // Молекулы и клетки. М.: Мир, 1977. Вып. 6. С. 113–135.
- Бреннер С. Исследование нематод // Перспективы биохимических исследований. М.: Мир, 1987. С. 120–122.
- Верецагин С.М., Лапичин В.И. Сравнительная физиология нервной системы беспозвоночных. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982.
- Дьюсбери Д. Поведение животных: Сравнительные аспекты. М.: Мир, 1981.
- Крушинский Л.В. Биологические основы рассудочной деятельности. М.: Изд-во МГУ, 1977.
- Резникова Ж.И. Структура сообществ и коммуникация животных. Новосибирск: Изд-во НГУ, 1997.
- Трут Л.Н. Очерки по генетике поведения. Новосибирск, Наука, 1978.
- Физиологическая генетика и генетика поведения. Л.: Наука, 1981.
- Эрман Л., Парсонс П. Генетика поведения и эволюция. М.: Мир, 1984.
- Klug W., Cummings M. Concepts of genetics. N.Y.; Oxford, 1994. P. 707–729.
- Snustad D., Simmons M., Jennings J. Principles of genetics. N.Y.: Wiley, 1977.

ГЕНЫ И ПАТОЛОГИЯ ПОВЕДЕНИЯ

Гены и патология поведения дрозофилы

Как это ни удивительно, но у дрозофилы есть гены, мутации которых вызывают изменения в поведении, напоминающие наследственные болезни человека. К таковым относится, в частности, рецессивная и локализованная в X-хромосоме мутация *drop-dead*, проявления которой напоминают хорею Гентингтона (Huntington), характеризующуюся нарастающим гиперкинезом конечностей, ранним началом и распространяющейся дегенерацией головного мозга. У мух – носителей мутации *drop-dead* первые день-два после вылупления наблюдалось нормальное поведение: фототаксис, геотаксис, спаривание, нормальная подвижность и полет. Впоследствии каждая особь становится менее активной, координация движения нарушается, животное падает на спину, бьет ногами и умирает. Переход от нормального поведения к смерти происходит в течение нескольких часов, однако время начала проявления синдрома варьирует: после начального периода число живущих мух уменьшается экспоненциально, при этом продолжительность половины жизни составляет два дня. Ген характеризуется полной пенетрантностью, все мухи умирают задолго до обычного срока. Смертность мало зависит от температуры и одинакова у гемизиготных самцов и гомозиготных самок. Генерозиготные самки нормальны, поскольку ген рецессивен. При использовании мозаиков по методу Бензера для изучения этой мутации было обнаружено, что гены, функционирующие в голове мухи, определяют, умрет ли она до срока или будет жить, в большей степени, чем гены, которые функционируют в тораксе или брюшке. Гистологический анализ мутантов, фиксированных до начала конвульсий, не выявил отклонений от нормы. Однако у мух, у которых уже появились признаки заблуждения, мозг изрешечен дырками. Последние сконцентрированы в определенных районах мозга, но захватывают и близлежащие области, в том числе зрительный ганглий. Другие отделы нервной системы, например торакальный ганглий, не обнаруживают таких нарушений. Таким образом, в данном случае, как и при хорее Гентингтона, дегенерация начинается в определенных участках мозга, затем следует общее ухудшение состояния, возникновение неконтролируемых движений и смерть. При этом кривая зависимости смертности от возраста мутантов *drop-dead* напоминает такую при болезни Гентингтона, только один день жизни дрозофилы соответствует примерно десятилетию жизни больного.

Предполагалось, что вариабельность во времени начала болезни зависит от действия генов-модификаторов. Однако в случае гена *drop-dead* обнаружено, что даже при постоянном генетическом фоне активность единичного гена может проявиться в разное время у разных осо-

бей. Различия с хореей Гентингтона заключается еще и в том, что ген этой болезни человека локализован в аутосоме и доминантен. Тем не менее, параллелизм в проявлении действия двух генов у столь различных животных удивителен, хотя в свете теории параллелизмов А.А. Заварзина вполне закономерен.

Генетически детерминированная аудиогенная эпилепсия

В настоящее время считается, что количество больных эпилепсией составляет 1% населения. Примерно 40% страдающих этим заболеванием поддаются медикаментозному лечению, нейрохирургическая же резекция ткани мозга применима у эпилептиков далеко не во всех случаях. Сказанное предопределяет необходимость тщательного изучения данного заболевания. Широкое разнообразие эпилепсий, их моделей, а также методов их исследования указывает на необходимость анализа клеточных и молекулярных механизмов их инициации и развития, что важно для развития новых подходов к лечению эпилепсий. Огромное значение имеют экспериментальные модели эпилепсий, вырабатываемые у животных. Наиболее перспективным представляется использование наследственных моделей эпилепсий на животных, так как молекулярно-генетические методы позволят понять этиологию эпилепсии человека, а в совокупности с современными морфологическими и другими методами – узнать, как генные мутации приводят к эпилептическому фенотипу. Кроме того, наследственные эпилепсии – удобная экспериментальная модель для исследования мозга вообще. Особенно хорошо изучена в этом отношении наследственная аудиогенная эпилепсия у грызунов, в частности у крыс линии Крушинского – Молодкиной, выведенной в Московском университете. Животных помещали в камеру с электрическим звонком, возбуждение вызывали с помощью сильного звонка, около 112 децибелл. Реакция животного на звук показана на рис. 8.1.

Возбуждение в ответ на действие звукового раздражителя протекает в виде одной или двух волн двигательной активности.

В случае одноволнового возбуждения при включении звукового раздражителя, обычно через 3–5 с, начинается интенсивное двигательное возбуждение. В большинстве случаев в момент максимального возбуждения развивается судорожный припадок. Таким образом, от начала возбуждения и до судорожного припадка или до момента выключения звукового раздражителя крыса все время находится в состоянии непрерывного возбуждения (рис. 8.1, а).

При двухволновом возбуждении через 5–15 с после включения звукового у крысы начинается возбуждение, которое через 5–10 с внезапно обрывается, наступает период торможения, когда животное неподвижно застывает на месте. Через 10–20 с начинается вторая волна двигательного возбуждения, которая заканчивается судорожным припадком или продолжается до конца действия звукового раздражителя. Родословная линии Крушинского–Молодкиной (КМ), селекционирован-

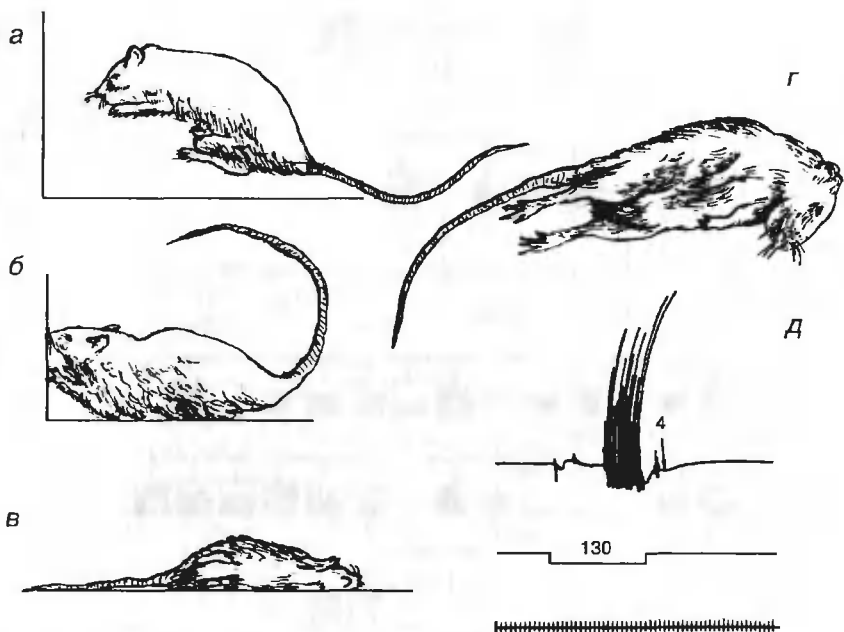


Рис. 8.1. Последовательные стадии развития аудиогенного эпилептического припадка у крыс линии Крушинского – Молодкиной.

а – двигательное возбуждение крысы при действии звукового раздражения; *б* – судорожный припадок с падением крысы на брюшко; *в* – судорожный припадок с падением крысы на бок, клоническая фаза; *г* – судорожный припадок, тоническая фаза. По Крушинскому. *д* – двигательное возбуждение, проявляющееся в виде одной волны. Цифра (4) стоит на месте судорожного припадка (тоническая фаза). По Крушинскому.

ных на патологическую реакцию в ответ на прозванивание, демонстрирует полигенный характер данного признака (рис. 8.2).

С помощью нейроморфологического анализа удалось выявить целый ряд патологических изменений в мозге крыс линии КМ под влиянием эпилептических припадков. Наблюдались, в частности, кровоизлияния в оболочках мозга, а также разрывы мозговых венул, дегенеративные процессы в нервных клетках в коре головного мозга, гиппокампе, секреторных ядрах гипоталамуса, в ядрах слухового тракта. Все эти изменения являлись следствиями индуцированных звуком эпилептических припадков, что в общем свойственно структурам мозга в случае их перегрузки. Гораздо больший интерес представляет собой исследование морфологических и молекулярно-генетических основ межлинейных различий в реакции на звук и функционального состояния генетического аппарата в процессе осуществления этой патологической реакции. Наиболее известны две гипотезы возникновения эпилепсии вообще и, возможно, наследственно детерминированной аудиогенной эпилепсии: 1) концепция “эпилептического окружения” – нарушение регуляции

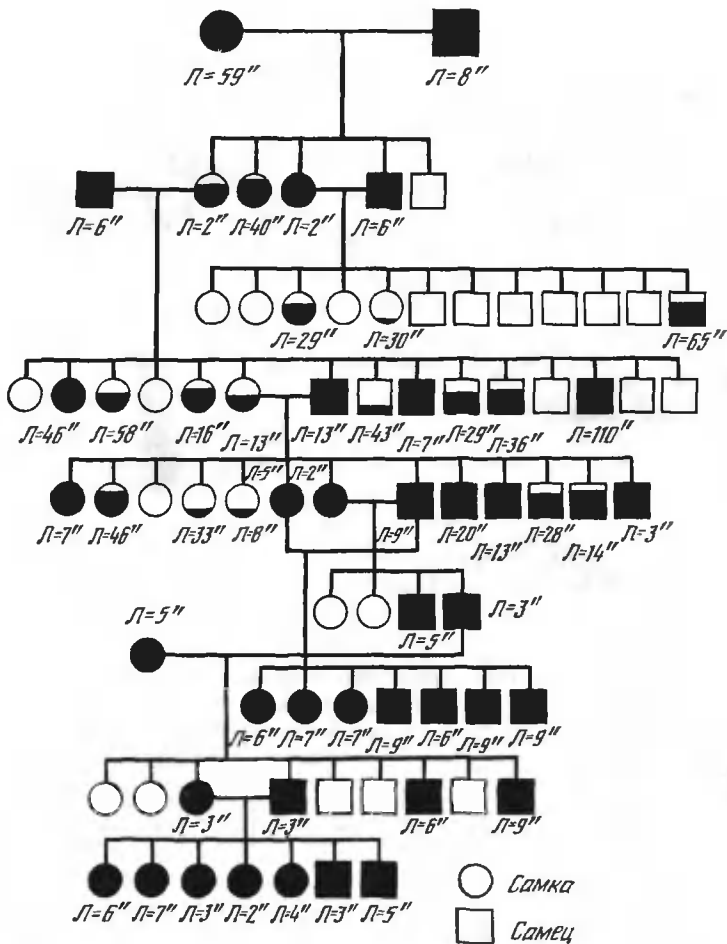


Рис. 8.2. Начало селекции крыс на "чувствительность" к звуковому раздражителю.

Полностью зачерненным квадратом (или кружком) обозначены крысы, проявившие в 100% испытаний патологическую реакцию возбуждения. частично зачерненный – иллюстрируют процент проявления патологического возбуждения при действии звукового раздражителя, незачерненным обозначены крысы, не дававшие патологического возбуждения при действии звукового раздражителя. "Л" – средняя длительность латентного периода двигательной реакции возбуждения. По Крушинскому.

электролитного баланса и изменения в системах синаптической передачи, 2) концепция альтерации нейронов и глии. Обе гипотезы взаимосвязаны и дополняют друг друга.

Как отмечалось, основные ионы электрогенеза нейрона – ионы калия и натрия, чей градиент у синаптических мембран создается катионным насосом – Na, K-АТФазой. В первичном эпилептическом фокусе

мозга кошек найдено изменение энзиматической активности Na, K-АТФазы, а в культивированных астроцитах линии мышей с аудиогенной эпилепсией DBA/2J отмечается пониженное содержание ионов натрия. Повышенное содержание ионов K⁺ определено во время эпилептического припадка у кошек *in vivo*. В СА1 области гиппокампа 8–12-суточных кроликов обнаружена повышенная предрасположенность нейронов к деполяризации, а их активность, характерная для припадков, наблюдалась одновременно с понижением уровня Na, K-АТФазы. Применение конкурентных блокаторов рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA) устраняло припадки, указывая на необходимость синаптической активации этих рецепторов. Деполяризационный сдвиг мембранного потенциала при увеличении концентрации ионов K⁺ вызывает снижение выброса ионов K⁺ из клеток и, как следствие, набухание нейронов и глии и уменьшение внеклеточного пространства. При этом может происходить повышение синхронизированной активности нейронов СА1 области гиппокампа за счет формирования эфаптических контактов даже без синаптической стимуляции из СА3 области. Из набухания нейронов и глии может следовать наиболее характерный гистологический признак эпилептического мозга – изменения аммонова рога: его глиоз, значительная утрата пирамидных нейронов (наблюдается у 50% больных с височной эпилепсией). Предполагается, что интенсивные припадки приводят к развитию изменений гиппокампа, появление которых, в свою очередь, стимулирует дальнейшее развитие эпилепсии. При аудиогенной эпилепсии исходные морфологические изменения наблюдаются в корковом конце слухового анализатора (височная кора). По всей вероятности, аудиогенную эпилепсию следует рассматривать в качестве модели комплексной височной эпилепсии человека.

Легко заметить, что гипотеза клеточных альтераций мозга тесно связана с первой гипотезой. Известно, что Na, K-АТФаза играет ключевую роль в захвате ионов калия клетками глии в период “разрядки” нейронов. В то же время при эпилептогенных поражениях существенное место занимают структурные изменения глиальных клеток, заканчивающиеся разрастанием глии (глиоз). При изменении активности катионного насоса глиальные клетки становятся неспособными удалять калий из экстрацеллюлярного пространства, в результате чего формируется деполяризационный сдвиг мембранного потенциала нейронов. Отек глии как следствие увеличения концентрации ионов калия, способствует деформации мембран нейронов, сокращению и изменению их дендритов, что также может вызывать нарушение активности их катионного насоса и стимулировать эпилептизацию нейрона.

Существует также гипотеза о роли глии в уменьшении аудиогенных эпилептических припадков у линии мышей DBA/2J с возрастом. Было найдено, что увеличение активности глиального фермента карбоангидразы происходит в течение 24 суток после рождения. При определенном пороговом значении ее активности (с 25-х по 40-е сутки) наблюдается наибольший эпилептогенез. В дальнейшем аудиогенные эпилептические припадки начинают затухать при возрастании активности фермента.

В формировании эпилептических припадков играют роль также биогенные амины. У некоторых линий крыс с наследственным предрасположением к аудиогенным эпилептическим припадкам понижен уровень синтеза катехоламинов. При наследственном дефиците катехоламинов наблюдается частичная инактивация катионного насоса, что приводит к формированию клонического или тонического компонентов припадков. Применение лекарств, увеличивающих концентрацию внеклеточного норадреналина, вызывает максимальное уменьшение числа аудиогенных эпилептических припадков. Внутривентрикулярная инъекция адренорептико-адреналовой системы и адренэргических нейронов в раннем постнатальном развитии, может снижать интенсивность аудиогенных припадков или купировать их. В ряде опытов Л.И. Корочкина с соавт. пересадка эмбриональной ткани дорзального моста мозга крысы, содержащего катехоламинэргические нейроны, в гиппокамп мозга крыс, предрасположенных к аудиогенным эпилептическим припадкам, приводило к снижению этих припадков. Применение блокаторов альфа-2-адренорецепторов в экспериментах такого рода продемонстрировало, что супрессорное действие норадреналина производится через стимуляцию этих рецепторов.

При исследовании симпато-адреналовой системы у больных с височной эпилепсией отмечено снижение уровня экскреции адреналина и норадреналина, коррелирующее с частотой припадков. Поскольку у животных с аудиогенной эпилепсией также наблюдается пониженный уровень катехоламинов, аудиогенную эпилепсию животных можно рассматривать в качестве одной из экспериментальных моделей парциальной комплексной височной эпилепсии человека.

Существуют также данные о пониженной концентрации гистамина в гиппокампе, миндалине, среднем мозге, таламусе и гипоталамусе у крыс линии Крушинского–Молодкиной. Введение препаратов, увеличивающих уровень гистамина (метоприн), значительно уменьшало припадки у данной линии крыс.

Следует также отметить возможную роль возбуждающих и тормозных аминокислот в генезе наследственной аудиогенной эпилепсии.

Так, инфузия возбуждающей аминокислоты N-метил-D-аспартата в нижние бугры четверохолмия приводила к предрасположенности к аудиогенной эпилепсии даже у нормальных крыс линии Спрейг-Даули. При разрушении норадренэргической системы и одновременной инфузии NMDA в нижние бугры четверохолмия крысам линии GEPR наблюдался полный аудиогенный эпилептический припадок. Избыток возбуждающей аминокислоты в четверохолмии инициировал припадок, в то время как дефицит норадреналина вызывал его тонический компонент.

Была также выявлена роль в генезе аудиогенной эпилепсии – тормозной ГАМК-эргической системы нейронов. Ингибирование функций этой системы может вызвать аудиогенный эпилептический припадок. Введение бикикулина, антагониста ГАМК, крысам линии Вистар вызывало припадки, однако без их тонического и клонического компонентов, что отражает экспериментально индуцированный дефект ГАМК-эргической синаптической передачи. Применение ингибитора захвата

глией ГАМК на мышцах с аудиогенной эпилепсией приводило к блокаде фазы тонического напряжения нижних конечностей. Исследование синапсом гиппокампа у мышей линии Rb, генетически предрасположенной к аудиогенной эпилепсии, показало выраженное снижение количества ГАМК в этом образовании. Выявлено уменьшение частоты аудиогенных эпилептических припадков у крыс линии GEPР при инъекции ГАМК в нижние бугры четверохолмия. В то же время с помощью иммуногистохимической техники с использованием антител к ферменту синтеза ГАМК – глутаматдекарбоксилазы обнаружено повышенное содержание ГАМК-эргических нейронов и окончаний их отростков в зубчатой фасции гиппокампа и в нижних буграх четверохолмия. Установлено, что эти нейроны являются так называемыми корзинчатыми клетками, которые посылают тормозные импульсы на гранулярные клетки фасции дентата. На основании полученных данных предполагается, что корзинчатые клетки вследствие увеличения их количества начинают реципрочно посылать ГАМК-эргические аксоны, в результате чего конечная корзинчатая клетка, дающая тормозный аксон на гранулярную клетку, становится неактивной. С помощью гибридизации *in situ* на срезах мозга с использованием в качестве зонда ДНК, кодирующей глутаматдекарбоксилазу, подтверждена возможность увеличения количества ГАМК-эргических нейронов. А российский физиолог Н.И. Ермакова показала, что трансплантация эмбриональных ГАМК-эргических нейронов в мозг предрасположенных к аудиогенной эпилепсии крыс снимает индуцируемые звуком эпилептические припадки, что подтверждает гипотезу о роли этих нейронов в генезе аудиогенного эпилептического припадка. Есть свидетельства, что увеличенное число ГАМК-эргических нейронов характерно для определенных областей мозга и существует до начала приступов. Эти изменения связаны с геном или группой генов, которые необходимо исследовать, для того чтобы установить, как программируется развитие ГАМК-эргических нейронов. При изучении линии мышей, несущей доминантный ген *Er*, предрасполагающий к судорогам при встраивании животных, установлено, что в гомогенатах их мозга содержание ацетилхолина (АХ) и ГАМК повышено в полтора раза по сравнению с контрольной линией мышей. Предполагается, что в данном случае предрасположение к судорогам связано с усиленным синтезом АХ и ГАМК во все возрастные периоды вплоть до зрелости, когда из-за нарушения равновесия между АХ и ГАМК появляется специфическая судорожная готовность.

Обнаружены также различия в темпах биохимической дифференцировки мозга между крысами линии Крушинского–Молодкиной и линии, резистентной к действию звука. В лаборатории Л.И. Корочкина показано, что по целому ряду показателей нервная ткань крыс резистентной линии дифференцируется быстрее, чем чувствительной линии. Это касается спектра водорастворимых антигенов мозга (тотальных и органоспецифических), спектра эстераз, количества РНК на клетку ядра Дейтерса, интенсивности включения меченых предшественников в РНК ядра и цитоплазмы нейронов ядра Дейтерса и коры головного мозга и т.д. При этом близкая к зрелому состоянию биохими-

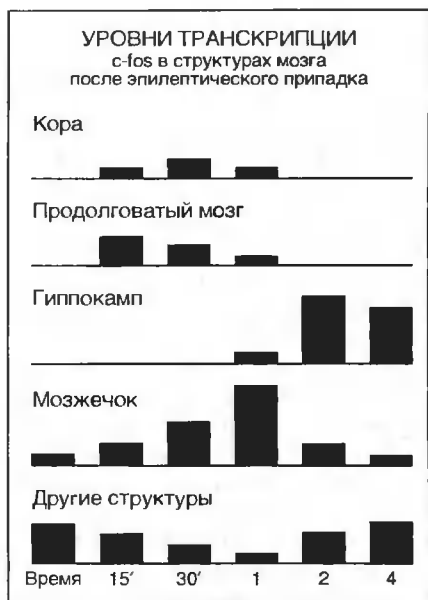


Рис. 8.3. Активность гена *c-fos* в различных отделах мозга крыс в различные периоды времени после эпилептического припадка. По Рыскову и др.

ческая характеристика мозга складывается к 18–21 дням жизни животных – ко времени первых проявлений эпилептиформной реакции в ответ на прозванивание. У взрослых крыс линии Крушинского–Молодкиной содержание РНК в расчете на один нейрон ядра Дейтерса достоверно выше, чем у чувствительных к прозваниванию крыс: 487 ± 12 и 437 ± 11 пикограмм, соответственно. Соотношение включения меченого H^3 -уридина в РНК цитоплазмы и ядра также выше у

крыс эпилептической линии для нейронов ядра Дейтерса и коры головного мозга. Эти различия складываются еще до появления способности к патологической реакции на звук, т.е. не являются вторичными, связанными с эффектом прозванивания, а наследственно детерминированы. В случае многократных прозваниваний количество РНК на клетку ядра Дейтерса постепенно снижается, у резистентных крыс прозванивание не отражается на количестве РНК в этих клетках.

Сходные результаты дал также блот-анализ *c-fos* РНК мозга крыс обеих линий, проведенный в лаборатории А.П. Рыскова (рис. 8.3). Анализ гистограмм распределения нейронов ядра Дейтерса контрольных и подопытных животных по содержанию РНК на одну клетку показал, что сдвиг среднего количества РНК на клетку обусловлено не равномерными изменениями во всех нейронах данной популяции, но уменьшением или увеличением количества РНК в ограниченной группе, так сказать, “дежурных” клеток. Это, возможно, косвенно отражает соотношение числа покоящихся и активно функционирующих нервных клеток в очаге возбуждения (рис. 8.4).

Серия последовательных прозваниваний, ведущих к снижению содержания РНК в нейронах, приводит к временной утрате крысой способности реагировать на звук эпилептическим припадком. Сходный результат зарегистрирован при снижении содержания РНК в нейронах с помощью интрацеребральной инъекции малых доз антибиотика актиномицина, подавляющего синтез РНК (рис. 8.5–8.6). Отсюда можно сделать вывод, что складывающиеся различия в синтезе РНК в клетках мозга имеют прямое отношение к формированию физиологических различий в реакции на звук. Можно также заклю-

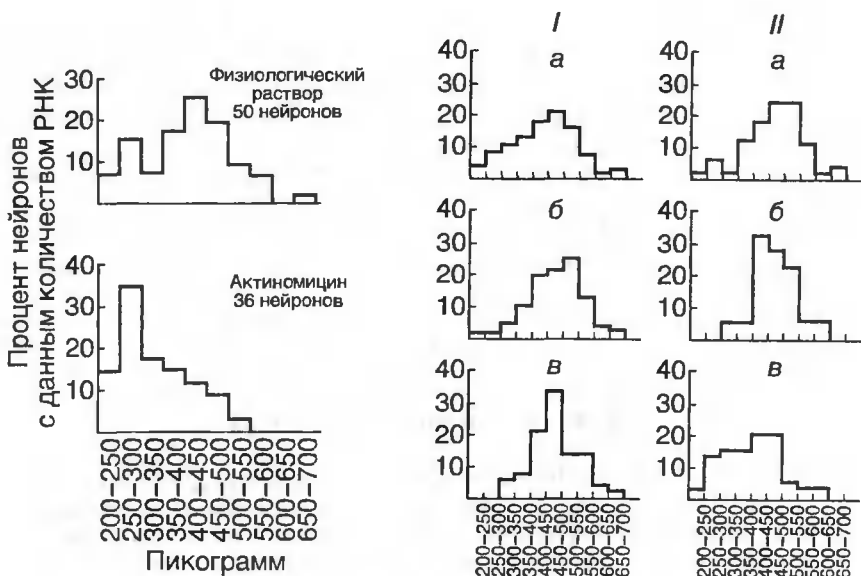


Рис. 8.4. Влияние внутримозговой инъекции актиномицина D на содержание РНК в нейронах ядра Дейтерса. По Корочкину, Максимовскому и др.

Рис. 8.5. Изменения распределения нейронов ядра Дейтерса по содержанию РНК в них при разных функциональных состояниях.

По горизонтали – количество РНК на один нейрон (в пг), по вертикали – число клеток с данным содержанием РНК (в процентах к общему числу исследованных). I – крысы, устойчивые к звуку. II – крысы, высокочувствительные к звуку (линии Крушинского–Молодкиной). а – контроль, б – 1 звуковое раздражение, в – 5 звуковых раздражений. По Корочкину, Максимовскому и др.

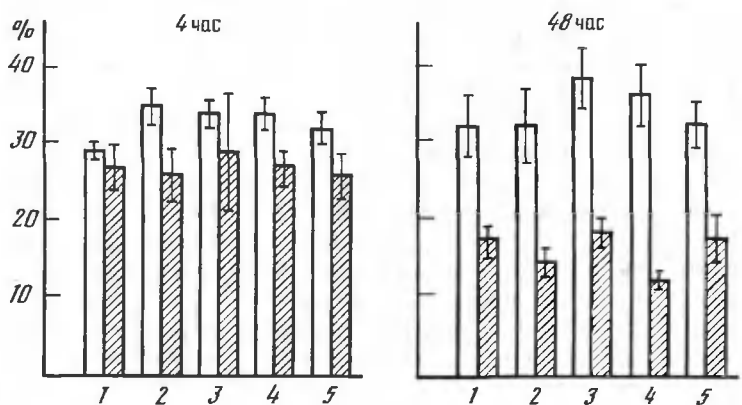


Рис. 8.6. Интенсивность синтеза белков в мозге крыс после введения 8 мкг актиномицина.

1 – большие полушария, 2 – стволовая область, 3 – мозжечок, 4 – гиппокамп, 5 – область ядра Дейтерса. Светлые столбики – контроль, заштрихованные – опыт. По оси ординат – относительная удельная активность в %. По Корочкину, Карасик.

чить, что эпилептический припадок отражается на функционировании генетического аппарата нервных клеток. При этом, как установил А.П. Рысков с сотрудниками, в первую очередь возрастает транскрипционная активность *c-fos* генов, а затем транскрипционная активность генома в целом (см. рис. 8.3).

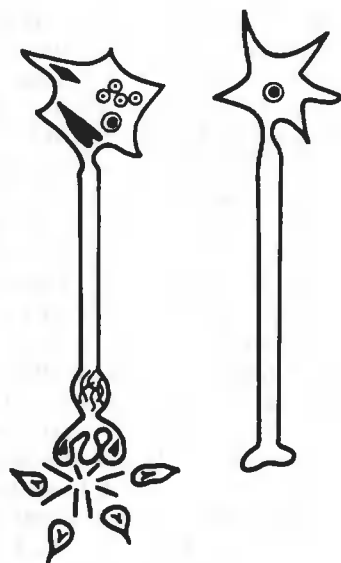
Складывается впечатление, что имеет место не активация каких-либо новых генов, но интенсификация транскрипции уже функционирующих генов, вызванная повышением физиологической нагрузки. Иными словами, особенности организации функциональной системы, обеспечивающей определенный (нормальный или патологический) характер реакции на прозванивание, являясь генетически детерминированными, складываются в процессе индивидуального развития.

Гены и болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера, или старческое слабоумие, развивается в относительно раннем возрасте (60 лет), чаще у женщин. Она протекает с выраженным нарушением поведения – двигательным возбуждением маниакального типа, суетливостью. Распадается речь, больные утрачивают способность пользоваться словом, зачастую произносят лишь нечленораздельные звуки. Постепенно исчезают двигательные навыки (апраксия), как сложные (шитье, разборка мясорубки), так и элементарные (открыть спичечную коробку, одеться, обуться и т.д.). Нарастают расстройства памяти: больные не могут вспомнить не только имена своих родственников (жены, детей), но и собственного имени, нередко называя себя именем отца или сына. Не знают свой возраст, не помнят профессии, неспособны понимать метафорический смысл речи, не замечают несообразности в рисунках. На фоне прогрессирующего слабоумия выступает ослабление активного внимания, оскудение запаса представлений, аффективные расстройства в виде вялости, безразличия к окружающему, иногда сменяющиеся приступами раздражительности и моторного беспокойства. Наблюдаются отрывочные бредовые идеи ущерб, ограбления или преследования и отравления.

В большей части случаев болезни Альцгеймера сначала поражаются речевые функции онтогенетически более высоких, позднее достигнутых уровней. Так, нарушается семантическое понимание речи при сохранении звуковых образований слов. Письмо и чтение нарушаются очень рано. Сильно поражаются первая височная и сенсорная извилины коры головного мозга. Атрофия коры головного мозга постепенно распространяется и на зрительную кору, однако расстройства зрения наблюдаются редко. Очень сильно поражаются передние, dorзо-медиальные, задние и передне-боковые ядра зрительного бугра. Поражение зрительного бугра – важная основа для возникновения психических расстройств, так как через зрительный бугор (*thalamus opticus*) и через измененную ретикулярную формацию поступают неправильные сведения из окружающей среды, способствующие дезинтеграции деятельности коры головного мозга, пораженной и без того атрофическим процессом.

Рис. 8.7. Схематическое изображение нормальной нервной клетки (справа) и клетки, пораженной болезнью Альцгеймера (слева). У заболевшего нейрона выявлены три типа патологии в клеточном теле. Это NFT, нейрофибрилярные клубочки – треугольник с неровным основанием, тельце Хирано (ромб) и GVD – кружочки с точками. NFT – содержат фосфорилированные филаменты, тау, MAP2, Aβ8, убиквитин. Тельца Хирано содержат актин и ассоциированные с ним белки, в то время как GVD обнаруживают иммунореактивность на тубулин. Дистальная часть аксона большой клетки характеризуется наличием варикозных расширений, в нервных терминалях накапливаются филаменты (малые треугольники), показывающие иммунореактивность, сходную с таковой NFT. Соседние с терминалями черточки представляют отложение экстрацеллюлярных амилоидных фибрилл. Ассоциация нейритов и амилоида формирует сенильную бляшку. Амилоидные фибриллы присутствуют также вблизи кровеносных сосудов (не показано). По Price, 1989.



При гистологическом анализе в пораженных нервных клетках различных отделов мозга (кора головного мозга и подкорка) выявляется повышенное содержание липофусцина (жировое перерождение), количество жирового пигмента возрастает настолько, что ядро оттесняется в сторону и выбухает из плазмы (рис. 8.7). Характерным является также образование в мозгу сенильных амилоидных бляшек. В конце концов перерожденные нервные клетки погибают. На месте погибших нейронов остаются кучки пигмента и зернистые шары. Глия умеренно разрастается, при этом в глиальных клетках также обнаруживается липофусцин. Выявляются также признаки артериосклероза.

В ходе заболевания дегенерируют нейроны, локализованные в холинергическом комплексе базального переднего мозга, в нескольких моноаминергических ядрах ствола мозга, в миндалевидных ядрах (amygdala), гиппокампе и неокортексе. В пораженных нейронах обнаруживают нейрофибрилярные клубочки – “tangles” (NFT) в области перикариона, некоторые аксоны, дендриты и нервные терминали увеличиваются и расширяются в области сенильных бляшек. Эти ненормальности обусловлены нарушениями в элементах цитоскелета, включая тау белок, ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP2), белки нейрофиламентов. В дегенерирующих нервных клетках могут экспрессироваться и другие белки, в частности Aβ8 (белок 68 kDa, содержание которого увеличено в мозгу пациентов с болезнью Альцгеймера) и убиквитин (ubiquitin, белок, необходимый для аденозинтрифосфат-зависимого протеолиза), который не присутствует в избытке в нормальных клетках. Пораженные нейроны погибают, и в мишенях, снабженных их отростками, наблюдается уменьшение соответствующих медиаторных (нейротрансмиттерных) маркеров. Типичным признаком болезни

Альцгеймера является также отложение белка амилоида вокруг кровеносных сосудов и внутри специфических бляшек, где нейриты ассоциируются с экстрацеллюлярными скоплениями амилоидных фибрилл. Одним из основных компонентов амилоида является 4-kDa бета-белок (ВАР или А4), “truncated form” белка-предшественника амилоида (APP), кодируемого геном, расположенным в 21-й хромосоме. Показано, что состояние центральных холинергических нейронов, в первую очередь поражаемых при болезни Альцгеймера, зависит от фактора роста нервов (NGF). Однако изменения его содержания не играют первичной роли в дегенерации холинергических нейронов: NGF может быть полезен для спасения некоторых из них в ходе заболевания. Реакция моноаминергической системы ствола мозга более вариабельна. В некоторых серотонин-норадреналинергических нейронах (raphe complex и Locus coeruleus соответственно) были также обнаружены NFT и формирование бляшек. Количество моноаминергических клеток может быть редуцировано. Нарушения норадренергической системы лежит в основе развития у пациентов депрессивного состояния. В amygdala обнаруживаются NFT, бляшки и гибель нервных клеток. В нервных клетках гиппокампа развиваются NFT и другие нарушения цитоскелета, при этом самыми ранимыми оказываются клетки в зоне СА1. Характерны патологические изменения в глутаминергических нейронах энторинальной коры, отделяющей гиппокамп от неокортекса. По-видимому, именно эти изменения приводят к резкому ухудшению памяти у пациентов с болезнью Альцгеймера. В неокортексе в избытке встречаются NFT и бляшки, а также отмечается редукция количества нейронов, включая клетки, которые вырабатывают в качестве нейротрансмиттеров кортикотропин-рилизинг фактор (CRF), или соматостатин. При этом снижается количество соматостатиновых и глутаматных рецепторов, но количество CRF рецепторов увеличено.

Во многих патологически измененных нейронах развиваются NFT. Для пирамидных клеток гиппокампа характерно образование интрацитоплазматических так называемых телец Хирано (Hirano bodies) – палочкообразных паракристаллических рядов актиновых микрофиламентов, актин-ассоциированных белков и так называемого tau-белка, а также грануловакуолярная дегенерация (кластеры электроно-плотных гранул, обогащенных тубулиноподобными белками).

Экстрацеллюлярные амилоидные фибриллы, составленные первоначально из 4-kDa ВАР, присутствуют в бляшках и в кровеносных сосудах, ассоциированы с сульфатированными глюкозаминогликанами и альфа-антихимоитрипсином, ингибитором сериновой протеазы. В бляшках обнаружено также отложение алюмосиликата (aluminosilicate).

Расстройства памяти при данном заболевании связывают с утратой в гиппокампе рецепторов к N-methyl-D-aspartate (NMDA) возбуждающей аминокислоте, которая была обнаружена в ряде случаев болезни Альцгеймера.

Детальные биохимические и гистохимические исследования показали, что болезнь Альцгеймера является комплексным заболеванием, затрагивающим холинергические, норадренергические, глутаминерги-

ческие, ГАВА-эргические и некоторые пептидэргические нейроны. Патологический процесс носит генерализованный характер и захватывает кору головного мозга, гиппокамп, подкорковые ядра и иннервируемые ими области.

В Японии была получена экспериментальная модель болезни Альцгеймера на крысах. Для этой цели вводили в церебральную кору животных конъюгат NGF-дифтерийный токсин, что вызывает ипсилатеральную редукцию холинэргических нейронов в горизонтальном конце (horizontal limb) диагональной полосы (diagonal band) и базальном магноцеллюлярном ядре. Не было выявлено эффекта на холинэргические нейроны латеродорзального ядра тегментум и ряда других ядер. Инъекции конъюгата в каудопутамен не вызывали изменений в холинэргических нейронах стриатум. Поскольку данная методика вызывала избирательную редукцию холинэргических нейронов в базальном переднем мозгу без нарушений в холинэргических нейронах, экспериментальные животные могут быть использованы для изучения некоторых сторон болезни Альцгеймера.

Другая модель была получена на мышах в США, где отселектировали линию этих животных, мутантных по гену, кодирующему белок – предшественник амилоида (APP). У этих мышей обнаруживаются некоторые симптомы болезни Альцгеймера, включая появление нейрофибриллярных tangles, а также образование в нервных клетках амилоидных бляшек, содержащих пептид, высвобождающийся из APP. Этот амилоидный пептид (Абета42) имел длину от 39 до 42 аминокислот. Экспрессия этого пептида у мышей мутантной линии с пептидом длиной 42 аминокислоты увеличивалась в 14 раз по сравнению с 5-кратным увеличением у мутантов с длиной пептида 40 аминокислот. Анализ экспериментальной модельной системы позволил предположить, что именно пептид Абета42 играет основную роль в отложении амилоидного (крахмалоподобного) белка в нервных клетках при болезни Альцгеймера.

Среди молекулярно-генетических гипотез, объясняющих болезнь Альцгеймера, особенно популярна так называемая гипотеза амилоидного каскада, выдвинутая в 90-е годы Ж. Харди (Hardy) и Дж. Хиггинс (Higgins) (рис. 8.8). Согласно этой гипотезе отложение амилоидного белка – главный момент в развитии заболевания. Феноменологические ее проявления, такие, как формирование нейрофибриллярных “tangles”, васкулярные расстройства, гибель клеток, старческое слабоумие (деменция), представляют собой результат этого отложения. Как уже отмечалось, АбетаР происходит из предшественника APP и образует нерастворимое экстрацеллюлярное отложение. При этом ген APP претерпевает альтернативный сплайсинг РНК, так что формируется несколько изоформ белка. Преобладающий в мозгу вариант утрачивает домен, ингибирующий сериновую протеазу и присутствующий в APP молекулах в других тканях. В настоящее время известно, как протеолиз APP ведет к отложению АбетаР в ткани мозга. APP инсертируется в цитоплазматическую мембрану и затем дробится на фрагменты длиной от 15 до 17 аминокислот внутри АбетаР последовательности ферментом секретазой. В результате этого дробления появляются фрагменты, которые не содержат интактного АбетаР и потому не могут вызвать от-

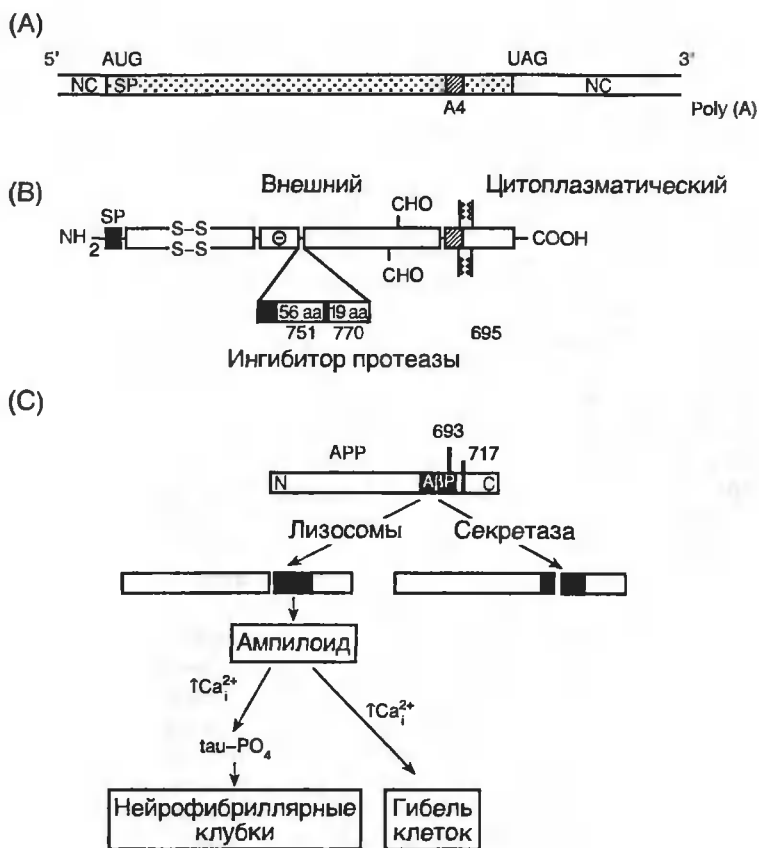


Рис. 8.8. Верхняя схема иллюстрирует APP кДНК и предполагаемую структуру белка APP.

А – видна кодирующая область APP (A4 предшественник) кДНК (точки) с VAP/A4 сегментом (заштриховано) вблизи 3' – конца гена. В – показана предполагаемая доменная структура APP-D (695 аминокислот) и протеазные инсерты (APP-1). Сигнальная последовательность соседствует с цистеин-богатым доменом и отрицательно заряженной областью. Инсерты с протеазным ингибитором (черная полоска) кодирует 56 (APP-II, 751) и 19 (APP-12, 770) аминокислот соответственно. С сайты гликозилирования расположены в экстрацеллюлярном домене, остатки С-терминального домена выступают в цитоплазму. Область VAP/A44 (заштрихована) частично “вставлена” внутрь трансмембранного сегмента, этот маленький пептид путем самосборки формирует амилоидные фибриллы в микросреде нейропиля. С – гипотеза амилоидного каскада. Процессинг APP может происходить двумя путями: *i* – дробление внутри АβетаР секретазой, которое генерирует образование пептидных продуктов; *ii* – дробление в эндосомно-лизосомном компартменте, вызывающее образование интактного АβетаР белка, который осаждается и формирует амилоид, вызывает образование нейрофибриллярных бляшек и гибель клеток, что является признаком болезни Альцгеймера. По Hardi, Higgins, 1992.

ложения амилоида. Эти фрагменты включают секретируемые NH_2 -терминальные производные, которые могут быть определены в мозгу и цереброспинальной жидкости. APP секретаза, которая режет внутри АβтаР области, узнает вторичную структуру и дробит APP на определенном расстоянии от мембраны. Кроме того, APP может претерпеть процессинг иным, эндосомально-лизосомальным путем, после “recycling” мембран-связанного APP. Мутации в COOH-терминальной порции APP вызывают раннюю, наследственную форму болезни Альцгеймера и наследственные церебральные геморрагии (кровоизлияния) с амилоидозом (Dutchtype). Мутация APP гена, которая вызывает массивное отложение амилоида в случае Dutch амилоидопатии, связана с замещением глутаминовой кислоты на глутамин в кодоне 693. Предполагается, что эта мутация вызывает амилоидоз, тормозя дробление APP секретазой. Описано также три вызывающие болезнь Альцгеймера мутации внутри гена APP, в кодоне 717. Все они связаны с замещением валина, локализованного на расстоянии трех остатков от COOH-конца АβтаР, на изолейцин, фенилаланин или глицин. Возможно, эти мутации тормозят выщепление терминального COOH-фрагмента АβтаР из APP и нарушают прикрепление APP к клеточной мембране.

Согласно предложенной гипотезе сам АβтаР или продукт дробления APP, содержащий АβтаР, нейротоксичны и обуславливают образование нейрофибриллярных tangles и в итоге – гибель клеток.

Таким образом, необходимы два последовательных события, чтобы вызвать патологические симптомы, свойственные болезни Альцгеймера:

1) должен быть накоплен АβтаР как самостоятельная единица или в составе фрагмента APP;

2) эти вещества должны вызвать формирование нейрофибриллярных “tangles” и последующую гибель нервных клеток.

Следует, однако, учитывать, что мутации в APP гене ответственны за происхождение лишь очень малой доли случаев болезни Альцгеймера (2–3%). Предполагается, что за другую долю случаев этого заболевания ответственны генные мутации, являющиеся триггерами, факторами разрешающими отложение амилоида.

Действительно, в последнее время выявлено еще три гена, ответственных за генез болезни Альцгеймера (табл. 3). Один из них, повышающий риск заболевания, локализован в 14-й хромосоме (зона 14q24.3) и кодирует мембранный белок S182, который обуславливает наследование болезни как аутосомного доминантного признака (рис. 8.9). Это локус (AD3) детерминирует возникновение очень злокачественной формы болезни Альцгеймера. Идентифицировано по меньшей мере 19 различных транскриптов, кодируемых этой областью. Один из них (S182) соответствует продукту нового гена описанного Е.И. Рогаевым и др., ответственного за развитие болезни Альцгеймера и содержащего множественные трансмембранные домены*. Он очень похож на

* Недавно показано, что описанные Рогаевым и др. белки. пресенилины, участвуют в расщеплении белков APP и NOTCH. Мутации соответствующих генов ведут к нарушению нормального их расщепления и к болезни Альцгеймера или к Notch-подобным дефектам развития (см. Nature. 1999. № 398. P. 466).

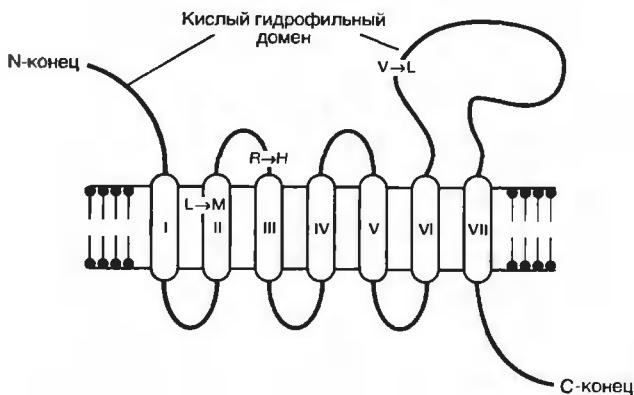


Рис. 8.9. Схематическая организация S182 белка.

Трансмембранные домены нумеруются как I–VII, сайты N-гликозилирования отмечены звездочками, сайты FAD мутаций обозначены горизонтальными стрелками. По Р. Шеррингтону, Рогаеву и др. 1995.

белок, интегрированный с мембраной (an integral membrane protein). Было найдено 5 различных missens мутаций, которые косегрегируют с ранним началом семейной болезни Альцгеймера. Эти мутации затрагивают консервативные домены данного гена.

Ген, кодирующий белок S182, ауtosомный, доминантный, вызывает 70–80% рано начинающихся семейных случаев болезни Альцгеймера. Его продукт имеет некоторое сходство с мембранным белком, известным как SPE-4 нематоды *Caenorhabditis elegans*. Изучение мутации SPE-4 у червей показало, что данный белок необходим для транспорта белков между клеточными компартментами в период формирования спермы. Сходство S182 белка с белком SPE-4 указывает на возможность того, что он может быть включен в транспортировку белков вну-

Таблица 3. Гены, мутации которых вызывают болезнь Альцгеймера (по Varinaga, 1995)

Хромосомная локализация	Тип гена	Возраст, годы	% Случаев		Белковый продукт
			Семейные	Все	
14	Ауtosомный Доминантный	30–60	70–80%	5–10%	S182 Мембранный белок
19	Фактор генетического риска	60+	–	40–50%	АpoE4
21	Ауtosомный Доминантный	45–65	2–3%	<1%	Белок-предшественник амилоида
?	Ауtosомный Доминантный	40–70	Примерно 20%	2–3%	?

три клетки. В нормальных клетках мозга APP транспортируется везикулами к клеточной плазматической мембране, где и разрезается на фрагменты с помощью специальных ферментов, и потому элементы бета-амилоида не могут накапливаться в нормальном мозгу. Если белок S182 играет роль в транспорте белка, то он, очевидно, включен в упаковывание APP в везикулы, а дефекты в S182 белке могут вызвать препятствия в транспортировке APP через клетку.

Возможно также, что при мутациях гена S182 соответствующий дефектный белок способен вообще прервать транспорт APP в клетку и тем самым способствует образованию сенильных амилоидных бляшек.

В любом случае обнаружение генов, от которых зависят поведенческие нарушения при болезни Альцгеймера, способствует лучшему пониманию как морфологических, так и молекулярно-генетических основ нормального поведения, а также позволяет разрабатывать новые диагностические тесты и методы коррекции этих нарушений.

Гены и нарушения поведения при некоторых других заболеваниях

Болезнь Паркинсона (паркинсонизм, дрожательный паралич) впервые описана Джеймсом Паркинсоном (Parkinson) в 1817 г. Начинается чаще в возрасте после 40 лет, характеризуется тремором (дрожанием) и мышечной ригидностью. Тремор наблюдается в покое и уменьшается при целенаправленных движениях. Постепенно нарастает мышечный тонус, по мере развития заболевания активные движения становятся все более и более скованными и замедленными (олиго- и брадикинезия). Неравномерное распределение тонуса приводит к нарушениям осанки (согнутая поза) и походки (мелкими шажками) без содружественного движения рук. При движении больного порой влечет вперед, назад или вбок. Лицо превращается в неподвижную маску. Речь становится монотонной и лишенной эмоциональной окраски. В далеко зашедших случаях больной не может встать, сесть, повернуться в постели. Часто наблюдаются вегетативные нарушения: трофические изменения кожи, учащенные сердцебиения, сальность лица. Больные постоянно находятся в состоянии внутреннего беспокойства и в подавленном настроении.

Морфологические изменения выявляются главным образом в области бледного шара (*Globus pallidus*) и черной субстанции. Страдают также *locus coeruleus*, гипоталамус, базальные ядра, церебральная кора, центральный и периферический отделы автономной нервной системы. Изменения выражаются в гибели ганглиозных, главным образом дофамин-эргических клеток с образованием пустот и пролиферацией глиальных клеток. Характерно также формирование внутриклеточных включений, называемых тельцами Lewy. Помимо изменений в подкорковых узлах обычно встречаются рассеянные, старческого характера изменения в различных отделах нервной системы. Они имеют гнездный характер и заключаются в перерождении, атрофии нервных клеток, утолщении сосудистых стенок, разрастании соединительной ткани и глии.

Паркинсонизм принадлежит к числу наследственных заболеваний и соответствующий ген, ответственный за генез заболевания, локализован в хромосоме 4 (4q21-q23). Этот ген был выделен и клонирован, его продукт – белок альфа-синуклеин (synuclein), пресинаптический белок нервных терминалей. Сначала он был идентифицирован как белок-предшественник для не-бета амилоидного компонента амилоидных бляшек, формирующихся при болезни Альцгеймера.

У крыс было идентифицировано три члена семейства синуклеинов, причем SYN1 обнаруживает 95% сходства с человеческим альфа-синуклеином, SYN1 у крысы экспрессируется во многих областях мозга, особенно высок уровень его содержания в ольфакторной луковице, в гиппокампе, gyrus dentatus, amygdala, piriform cortex, промежуточный уровень содержания найден в гранулярном слое мозжечка, черной субстанции, caudate-putamen, дорзальном шве. Этот паттерн экспрессии совпадает с распределением телец Леви, найденным у больных паркинсонизмом. Поражение ольфакторных путей при этом, по-видимому, имеет место особенно рано, поскольку нарушение чувствительности к запахам является одним из самых ранних проявлений заболевания.

У рыбки Данио (zebra fish) также найден гомолог синуклеина, это белок – синельфин, который принимает участие в процессах обучения и памяти. Возможно, синуклеин также вовлечен в эти процессы, что объясняет нарушения памяти при болезни Паркинсона.

Естественно, нельзя пока что говорить о расшифровке молекулярно-генетических механизмов болезни Паркинсона, но первый шаг в этом направлении сделан.

Группой И.А. Ивановой-Смоленской из Московского Института неврологии обнаружена в Бурятии уникальная форма наследственной атаксии (нарушение координации движений) – **X-сцепленной врожденной гипоплазии (недоразвития) мозжечка**. Первым признаком болезни была существенная задержка моторного развития ребенка, отмечаемая уже на первом году жизни. Дети не могли самостоятельно ходить до 10–15 месяцев, начинали ходить без поддержки лишь в возрасте 4–7 лет. Отмечалась также значительная задержка развития речи. К 6–7 годам развивались мозжечковая атаксия, дизартрия (расстройство речевых функций), ограничение латеральных и вертикальных произвольных движений глазных яблок. Особенностью, отличающей данное заболевание от сходных с ним форм патологии, является отсутствие у пациентов явных признаков умственной отсталости.

При компьютерной и магнитно-резонансной томографии головного мозга у больных были выявлены признаки гипоплазии полушарий и червя мозжечка, значительное расширение 4-го желудочка мозга и большой цистерны. Использование молекулярно-генетических методов исследования позволило картировать ген, ответственный за X-сцепленную гипоплазию мозжечка на цитогенетической карте в области Xp11.21-q24.

Интересные данные получены также в случае исследования молекулярных механизмов **бокового амиотрофического склероза** (болезни Шарко). Соответствующий ген был локализован в области 22q21.1. За-

болевание начинается в возрасте 25–65 лет с появления слабости и атрофии мышц сначала верхних, а затем и нижних конечностей. Наблюдается дизартрия, атрофия языка. В более поздний период развиваются периферические параличи с потерей подвижности и прогрессирующей атрофией мышц. Иногда обнаруживаются изменения высших корковых функций – возбуждение, смех, плач. Течение болезни злокачественное, ведущее к быстрой смерти.

В основе болезни лежит дегенерация моторных клеток спинного мозга, мозгового ствола и в меньшей степени пирамид Беца коры больших полушарий. Вторичные дегенеративные изменения в боковых и передних отделах спинного мозга характеризуются потерей миелина. Дегенеративные изменения преобладают в боковых столбах спинного мозга и в пирамидном пути. Уменьшается количество субстанции Ниссля в пораженных нейронах (хроматолиз, тигролиз). В цитоплазме клеток обнаруживаются специфические аргирофильные включения.

В последние годы показано, что при данном заболевании всегда наблюдаются точковые мутации в гене, кодирующем фермент Cu, Zn супероксид дисмутазу (SOD), которая катализирует преобразование супероксидного радикала, токсичного для клетки, в перекись водорода (hydrogen perioxide) и молекулярный кислород. У больных уровень этого фермента значительно (более чем на 50%) снижен в результате мутаций с заменой аланина на валин в экзонах 1, 2, 4 или 5-м.

Эффект мутации гена супероксид дисмутаза детально исследован на модельной системе – трансгенных мышах, содержащих поврежденный ген супероксид дисмутаза человека. Чужеродный ген экспрессировался в нервной ткани хозяина, в результате чего снижалась активность супероксид дисмутаза и наблюдались патологические изменения в центральной нервной системе, напоминавшие события, имеющие место при боковом амиотрофическом склерозе у человека.

Сходными были и клинические симптомы – первоначально у трансгенных животных обнаруживалась мышечная слабость, а через 2 недели одна или более конечностей были уже поражены параличом.

Можно с уверенностью сказать, что анализ такого рода модельных систем поможет найти пути исцеления от такой до сих пор неизлечимой болезни, как боковой амиотрофический склероз.

Еще одним случаем, заслуживающим упоминания, является одна из первых изученных в молекулярном плане болезней, затрагивающих поведение человека – **фенилкетонурия** (фенилпировиноградная олигофрения, болезнь Феллинга). Эта болезнь была открыта в 1934 г. норвежским ученым Феллингом и является одним из самых распространенных заболеваний, связанных с дефектом в метаболизме определенной аминокислоты. Согласно данным мировой статистики (1974 г.) частота ее среди населения разных стран колеблется от 1:5000 до 1:43 000. Она проявляется в первые месяцы после рождения и выражается в задержке моторного и психического развития. Ведущим клиническим симптомом болезни является слабоумие, развивающееся в разной степени у разных особей. Отмечаются также судороги, косоглазие, нистагм, нарушения координации движений. Биохимический анализ демонстрирует

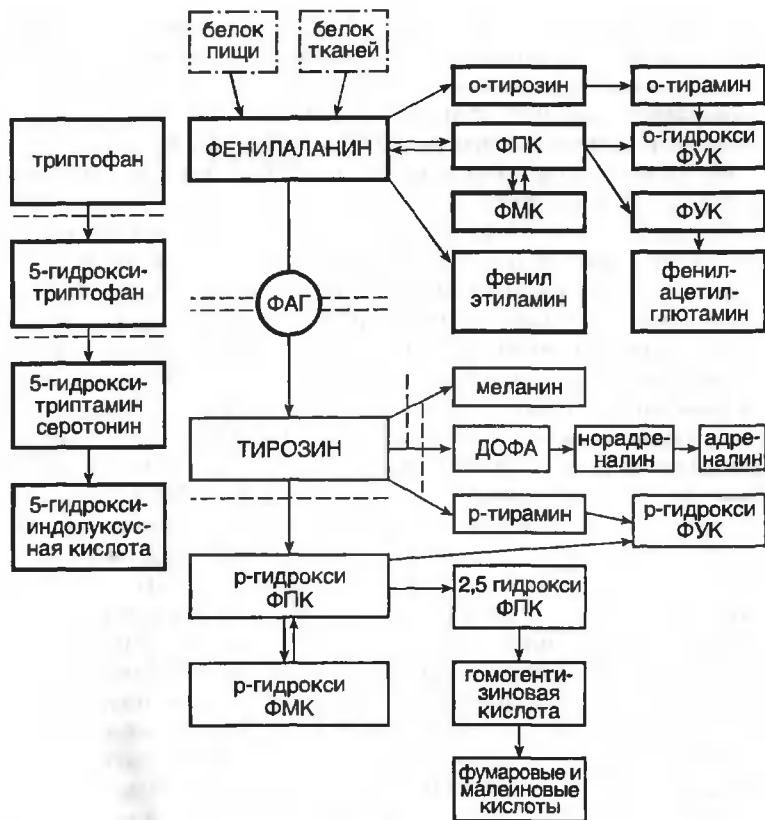


Рис. 8.10. Схема обмена фенилаланина, тирозина и триптофана при фенилкетонурии.

Первичный (сплошная линия) и вторичные (пунктир) метаболические блоки при фенилкетонурии.

ФАГ – фенилаланингидроксилаза, ФПК – фенилпировиноградная кислота, ФМК – феноломолочная кислота, ФУК – фенилуксусная кислота, ДОФА – 3, 4 диоксифенилаланин.

значительное повышение экскреции с мочой фунилпировиноградной кислоты, что является основой ранней диагностики заболевания.

При патоморфологическом исследовании находят демиелинизацию преимущественно в области перекреста (хиазма) зрительных нервов, а также глиозное перерождение мозга.

В основе развития заболевания лежит дефект (отсутствие или инактивация) фермента печени фенилаланин-4 гидроксилазы, в результате чего нарушается реакция гидроксирования фенилаланина в тирозин. Накопление в организме фенилаланина и его производных приводит к вторичным нарушениям обмена веществ в организме (рис. 8.10). Накопление в ткани мозга недоокисленных продуктов обмена (кетокислот) блокирует нормальное течение многих молекулярных процессов, при-

водит к нарушению формирования высших психических функций и проявляется в органической деменции и неврологической симптоматике. При этом отмечена корреляция между глубиной неврологических поражений и степенью молекулярного дефекта.

Фенилкетонурия относится к числу тех заболеваний, которые лечат на основе знания молекулярных механизмов их происхождения. Лечат с помощью специальной диеты, так что пищевой рацион больного ребенка лишен фенилаланина или содержит его в ничтожном, строго дозированном количестве.

Следовательно, зная молекулярно-генетические основы заболевания, можно лечить его, порой с помощью очень простых средств.

Интересные результаты были получены при исследовании 80 девочек и женщин в возрасте 6–25 лет с синдромом Тернера (синдром, характеризующийся хромосомным набором XO+44 или XXX+41 и проявляющийся в замедленном половом созревании, недоразвитии гонад, отсутствии менструаций, бесплодии, малом росте, умственной отсталости), у которых вся или часть X-хромосомы отсутствовала. При этом у 55 субъектов X-хромосома была материнской природы (X^M) и у остальных 25 – отцовской природы (X^O). У субъектов с X^M в большей степени, чем у субъектов с X^O , были выражены трудности в социальном поведении и познавательной деятельности. Детальный цитогенетический анализ показал, что эти особенности связаны с сохранением материнской X-хромосомой метилированного состояния небольшой ее области размером в несколько μ , возможно, в один ген (импринтинг), что сопровождается ингибированием функциональной активности этой области. Основываясь на данных такого рода, некоторые авторы в частности английский психолог и генетик Роберт Пломин, полагают, что **некоторые особенности интеллектуальной и познавательной деятельности могут определяться одним геном.**

Генетическая природа “болезней экспансии”. Болезни экспансии были обнаружены в 1991 г. Они вызываются так называемыми динамическими мутациями, которые найдены только у человека и не зарегистрированы ни у одного вида млекопитающих или других хорошо изученных организмов (дрозофила, нематоды и др.).

Суть мутации заключается в нарастании (экспансии) числа триплетных повторов, расположенных в регуляторной или кодирующей части генов.

Для триплетных повторов, экспансия которых блокирует функцию гена, характерен выраженный популяционный полиморфизм, причем число аллелей может варьировать от единиц до многих десятков. Другой их особенностью является доминантный тип наследования, свойственный как X-сцепленным, так и аутосомным генам. Характерной чертой практически всех болезней экспансии является эффект антиципации (ожидания), смысл которого заключается в нарастании тяжести симптомов заболевания в последующих поколениях, что является результатом дальнейшего увеличения (экспансии) числа триплетов после того, как оно уже превысило норму. Выявлены определенные особенности передачи заболевания потомству: для некоторых болезней (на-

пример, миотоническая дистрофия) типична передача по материнской линии, а для других (хорея Гентингтона) – в основном по отцовской линии. Молекулярный анализ этих генов выявил сходство механизмов экспансии триплетов, которая происходит в митозе, затрагивает чаще аллели с изначально большим числом повторов. Нередко сигналом экспансии является утрата негомологичного триплета, в норме разделяющего цепочку монотонных повторов. Часто динамические мутации блокируют экспрессию соответствующих генов. При нейродегенеративных заболеваниях, вызванных этими мутациями (хорея Гентингтона, спинально-бульбарная мышечная атрофия, спинальная амиотрофия Кеннеди, ряд наследственных атаксий и др.), экспрессия гена не нарушена. Однако образующийся белковый продукт с необычно длинной полиглютаминовой цепочкой нарушает неизвестным пока что способом процессы нормального метаболизма нервных клеток подкорковых отделов мозга. Именно эти события и вызывают нарушения в поведении пациентов, страдающими данной категорией заболеваний.

Хорея Гентингтона (хореическая деменция) характеризуется нарастающим гиперкинезом конечностей, который усиливается при эмоциональном напряжении. Болезнь начинается в возрасте 30 лет и старше. Порой начало заболевания связано с выраженными интеллектуальными расстройствами, иногда с психозом и бредом. Наблюдаются также нарушения речи, эмоциональная притупленность, эндокринные и нейрофизические нарушения.

При патоморфологическом исследовании обнаруживают атрофию мозга с преимущественным поражением лобной доли, сглаженность извилин, расширение и желудочков мозга. Особенно тяжелые изменения найдены в подкорке, в частности, в ритаме и хвостатом ядре, в области черной субстанции – увеличение содержания железа. В нервных клетках и периваскулярных пространствах выявляется жировой пигмент.

Молекулярно-генетический анализ больных хореей Гентингтона обнаружил наличие одной копии мутантного гена, несущего экспансию тандемных СAG-повторов. Число этих повторов в мутантных аллелях составляет от 40 до 78 (в контроле от 12 до 32). Сопоставляли степень экспансии тринуклеотидных повторов в мутантном гене и возраст появления первых симптомов заболевания и обнаружили обратную корреляцию между числом этих повторов и возрастом начала заболевания. Выявлена также прямая корреляция между числом повторов и темпом прогрессирования как неврологической, так и психической симптоматики, что свидетельствует о важной роли мутантного полиглютаминового района белкового продукта гена в поддержании патологического процесса на всех стадиях заболевания.

Хорея Гентингтона передается преимущественно от больного отца, при этом у детей наблюдается нарастание длины повтора, сопровождающееся более ранней манифестацией симптомов болезни. Проявляющаяся таким образом генетическая нестабильность гена хореей Гентингтона является молекулярной основой феномена антиципации, который заключается в утяжелении клинической картины заболевания и появлении его в более молодом возрасте в последующих поколениях.

Другим случаем экспансии тринуклеотидных повторов является болезнь Фридрейха, или спинально-мозжечковая атаксия (нарушение координации движений). Она проявляется, начиная с 7–13 лет и сопровождается нарушениями равновесия, дизартрией (расстройство членораздельной речи), мышечной слабостью, локальной атрофией мышц. Наблюдаются костные деформации – искривление грудного отдела позвоночника, различные изменения стопы. Характерны изменения сердечно-сосудистой системы – врожденные пороки сердца, хронический миокардит.

Отмечаются также подергивания глаза (нистагм), паралич глазодвигательных мышц, снижение слуха. Патологоанатомически обнаруживаются фиброзные утолщения и инфильтрация мягких мозговых оболочек, жировая дегенерация периферических нервов и дегенерация нейронов передних рогов спинного мозга, а также нервных волокон, соединяющих Варолиев мост с продолговатым мозгом и мозжечком. В сетчатке глаз полностью отсутствуют палочки, выражена атрофия ядерного и наружного слоев. В волокнах зрительных нервов наблюдается пролиферация глии, в склере – отложение липидов. Найдены также нарушения метаболизма липидов – дефект альфа-окисления фитола или его предшественника – фитиновой кислоты.

С помощью молекулярно-генетических методов у пациентов с болезнью Фридрейха выявлена экспансия tandemных GAA повторов в первом интроне гена X25. Все больные с классическим фенотипом этого заболевания имели гомозиготную экспансию GAA-участка, причем число tandemных повторов у них в одном или обоих аллелях гена превышало 400 копий. Показано, что возможны различные варианты проявления болезни и нарушений поведения пациентов, обусловленные гетерозиготностью по экспансии повторов или колеблемостью степени экспансии.

Еще одно заболевание, характеризующееся расстройством координации движений и обусловленное экспансией тринуклеотидных повторов, – **аутосомно-доминантные спиноцереbellарные атаксии**. Они сопровождаются прогрессирующей мозжечковой атаксией, дизартрией и проявляются в ряде форм. В случае каждой из них идентифицированы гены, содержащие экспансию тринуклеотидных CAG-повторов. Локализация зон экспансии разнообразна – в случае формы СЦА1 это хромосома 6p22–23, СЦА2 – 12q24.1, СЦА3 – 14q32.1, СЦА6 – 19p13, СЦА7 – 3p12–p21.1. Как обнаружено исследователями из Московского института неврологии в случае наиболее часто встречающейся СЦА1 формы имеет место обратная корреляция между числом tandemных тринуклеотидных повторов мутантного аллеля и возрастом появления первых симптомов болезни. У больных с наибольшей длиной повтора (50 копий CAG) и ранним проявлением симптомов (21–26 лет) болезнь характеризовалась особенно неблагоприятным течением. В группе больных с небольшой степенью экспансии повторов (39–45) наблюдалась значительная вариабельность возраста начала болезни и ее тяжести даже у пациентов в пределах одной семьи. Как и в случае хорей Гентингтона, проявляется тенденция к генетической нестабильности му-

тантного аллеля при его наследовании по линии отца. Нормальные аллели во всех случаях оставались генетически стабильными.

Таким образом, молекулярно-генетическая природа заболеваний человека находится в центре внимания современной нейрогенетики, и ее усилия направлены не только на изучение механизмов и природы этих заболеваний, но и на поиск методов эффективного их лечения на основе познания этих механизмов.

ЛИТЕРАТУРА

Веретенников Н.А., Куликова Д.А., Панин В.М., Корочкин Л.И. Биологические аспекты эпилепсии: Морфологические и молекулярные исследования аудиогеной эпилепсии // Успехи соврем. биологии. 1996. Т. 116. С. 407–417.

Давиденков С.Н. Клинические лекции по нервным болезням. Л.: Медгиз, 1957.

Иванова-Смоленская И.А. и др. Молекулярно-генетический анализ – новый этап в изучении наследственных заболеваний центральной нервной системы // Вестн. РАМН. 1996. Вып. 4. С. 6–10.

Ломброзо Ч. Гениальность и помешательство. М.: Республика, 1996.

Наследственные болезни. Ташкент: Медгиз, 1980.

Русских В.Н., Баницков Е.М., Русских В.В. Патологическая анатомия и патогенез психических заболеваний. М.: Медгиз, 1969.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СОБЫТИЯ, СОПРОВОЖДАЮЩИЕ ПРОЦЕССЫ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ

Попытки найти молекулы памяти

Вопрос о молекулярно-генетических основах памяти всерьез был поставлен лишь в 60-е годы выдающимся шведским цитологом Хольгером Хиденом (Holger Hyden).

Им были разработаны изящные и чрезвычайно тонкие методы, позволяющие анализировать количество РНК и белка в отдельной изолированной клетке, а также определять качественный состав РНК с помощью электрофореза на шелковых нитях. В опытах по обучению крыс Хиден и его сотрудники обнаружили, что количество РНК в тех нейронах крыс, которые предположительно имеют отношение к данной форме обучения, увеличивается, а ее качественный состав (содержание разных нуклеотидов) изменяется. Хиден пришел к выводу, что в ходе обучения активируются новые, ранее “молчавшие” гены, которые синтезируют новую матричную РНК (мРНК), являющуюся носителем памяти—молекулой памяти. Благодаря ее синтезу, т.е. функционированию в соответствующих нейронах неких новых участков ДНК, определенные поведенческие навыки запечатлеваются в мозгу животных. Важная роль в хранении следов памяти приписывалась так называемому белку S-100, количество которого также возрастало в ходе обучения.

В своей концепции Хиден уделил большое внимание взаимодействию нейронов и глии. Он установил, что параллельно увеличению содержания РНК в нейронах подопытных животных в той же пропорции снижается количество РНК в олигодендроцитах, окружающих эти нейроны, и сделал вывод о транспорте РНК из олигодендроцитов в нейроны в ходе обучения.

Затем последовало множество публикаций, в которых описывали опыты по влиянию торможения синтеза РНК и белков в мозгу с по-



Шведский цитолог Хольгер Хиден, основоположник молекулярной нейрогенетики.

мощью антибиотиков актиномицина, пурамицина и циклогексимида на процессы обучения разных видов животных (крысы, мыши, птицы, рыбы) и демонстрировалось, что такое вмешательство препятствует овладению разными навыками, в частности мешает нахождению правильно го пути при обучении в лабиринте. Результаты этих опытов как будто подтверждали гипотезу Хидена. Дальше больше: группа американских исследователей (F. Vabich и др.) выделила РНК из мозга обученных крыс и инъецировала ее в мозг необученных животных. Авторы сообщили, что подопытные животные обучались быстрее контрольных. Наконец, стали кормить необученных плоских червей планарий обученными и, регистрируя скорость обучения, обнаружили ее возрастание у подопытных планарий. Американский медик Камерон написал статью, в которой утверждал, что кормление пациентов с потерей памяти препаратами РНК способствует частичному ее восстановлению.

Гипотеза, которой не откажешь в красоте, тем не менее не подтвердилась. Методика определения качественного состава РНК, разработанная Хиденом и в свое время наделавшая много шума, оказалась слишком грубой и не отражала реальной ситуации, наблюдавшейся в клетке. Когда появилась более точная методика, оказалось, что качественных изменений РНК в нейронах при обучении не происходит, могут иметь место лишь изменения количественного соотношения разных фракций мРНК, уже существовавших в клетке. Взаимодействие глии и нервных клеток в ядре Дейтерса, которое исследовал Хиден, проанализировали с помощью электронной микроскопии. Оказалось, что олигодендроциты, транспорт РНК из которых в нейроны постулировал Хиден, в этом ядре не имеют контактов с нейронами и, следовательно, не могут служить источником дополнительной РНК для них. Шведский биолог А. Эдстрём (Edstrom) вместе с А. Грамппом (Grampp) обнаружили, что торможение синтеза РНК актиномицином в нейроне рецептора натяжения рака никак не сказывается на функции этой клетки. Опыты российского молекулярного биолога Е.В. Белявского на моллюсках показали, что при обучении улиток не происходит включения новых генов, но возрастает активность уже функционирующих зон ДНК, что можно наблюдать не только при обучении, но и при обычных физиологических нагрузках. Иными словами, наряду с гипотезой о существовании специфических молекул памяти получила молекулярно-биологическую поддержку и старая гипотеза Рамон-Кахалья, сводившая процесс запоминания к образованию новых функционально замкнутых нейтральных контуров, в которых циркулирует импульс возбуждения. При этом активное функционирование входящих в этот контур нервных клеток требует более интенсивного синтеза белка и соответственно мРНК, за счет чего и регистрируется повышение содержания этих веществ при обучении, которое в данном случае является для каждого нейрона обычной функциональной нагрузкой. Специфичность же процесса обучения реализуется не на молекулярном и даже не на клеточном уровне, а на уровне тканевом – нейронных ансамблей, осуществляющих приобретенный навык.

Что же касается влияния антибиотиков на процессы обучения, то,

как показал Корочкин, даже в малых дозах (меньших, чем те, что использовали в экспериментах по обучению) они способны вызывать патологические изменения в нервных клетках и даже гибель. Существенное значение имеет и то обстоятельство, что все используемые в такого рода экспериментах антибиотики нарушают проницаемость кровеносных сосудов, вызывая отечные явления, что, естественно, неблагоприятно сказывается на морфологии и функционировании нервной ткани. Более того, американским нейрохимиком Флекснером (Flexner) и др. было найдено, что антибиотики могут блокировать процессы синаптической передачи импульсов от нейрона к нейрону, т.е. вызывать физиологические нарушения в функционировании мозга независимо от того, каково состояние работы генетического аппарата нервных клеток. Таким образом, введение антибиотиков в мозг препятствует обучению, потому что выводит из строя целые функциональные ансамбли нервных клеток в зоне введения препарата. Регистрация скорости обучения в опытах по введению РНК обученных животных в мозг необученным оказалась дефектной. В письме крупнейших американских нейробиологов, опубликованном в журнале "Science" (1966, т. 153, с. 658–659), эти данные были опровергнуты. Эксперименты по проверке опытов с внутримозговыми инъекциями РНК проводились в большом объеме в Институте цитологии и генетики в Новосибирске, результаты во всех случаях были отрицательными. Что касается кормления планарий, то оказалось, что в теле обученных животных образуются стимуляторы, ускоряющие синаптическую передачу импульсов от нейрона к нейрону, именно это обстоятельство и обусловило поразительный эффект в экспериментах с каннибализмом.

Неудачей окончились и попытки приписать функции молекул памяти белкам и выделить белки, ответственные за специфичность того или иного приобретенного навыка. Наиболее известны работы в этом направлении американского нейробиолога Г. Унгара (G. Ungar), внимание которого привлек тот факт, что грызуны при возможности выбрать между темным и освещенным отделениями клетки предпочитают темноту. Унгар помещал крыс в ящик с выходом на освещенный манеж, в одном из углов которого находилось темное отделение. При попытке зайти в темное отделение крысы получали удар электрическим током, так что в конце концов у них пропадала охота прятаться в темноте. Если экстракт из мозга таких животных впрыснуть мышам, то они по утверждению Унгара отказывались заходить в темное отделение в отличие от контрольных мышей, которым вводили экстракт из мозга необученных крыс. Действующее начало было выделено из экстракта и оказалось пептидом, состоявшим из 15 аминокислот и получившим название "скотофобин" (от греч. скотофобия – боязнь темноты). Однако опыты Унгара не удалось воспроизвести, и они точно так же, как и опыты Бабича и др., были подвергнуты серьезной критике за методические дефекты. Собственно, у физиологов сразу после появления публикации Унгара возникли серьезные сомнения в интерпретации результатов его опытов. И действительно, как ничтожные количества введенного пептида могли направляться к нужным нейронам и проникать именно в

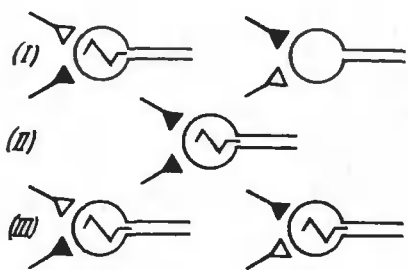


Рис. 9.1. Образование новых межнейронных связей по Хеббу

Показано, как два нейрона образуют синапсы на третьем. Сначала (I), когда активен нижний (темный) синапс, происходит возбуждение третьего нейрона, которое не может быть вызвано через слишком слабый верхний (светлый) синапс. Однако при одновременном воздействии обоих синапсов (II) третий нейрон тоже возбуждается и в нем происходит ряд последовательных биохимических процессов, которые усиливают прежде слабый верхний синапс. В результате (III) верхний синапс приобретает способность сам по себе вызывать реакцию третьего нейрона.

ческих процессов, которые усиливают прежде слабый верхний синапс. В результате (III) верхний синапс приобретает способность сам по себе вызывать реакцию третьего нейрона.

них, чтобы закодировать новую информацию? И если бы на самом деле существовали “пептиды памяти” и концентрация каждого из них была такой же, как концентрация скотофобина, то для кодирования воспоминаний на протяжении человеческой жизни их содержание в мозгу достигало бы сотни килограммов, что намного больше среднего веса нашего тела.

Можно думать, что в конечном итоге справедливой окажется гипотеза, выдвинутая Рамон-и-Кахалем и развитая Хеббом: процессы обучения реализуются на уровне нейронных ансамблей. **Гены контролируют не особенности поведения, не способы к обучению и запоминанию, а особенности организации мозга, составляющих его модулей и нейронных ансамблей. И уже через особенности этой организации наследуется специфика поведения как животных, так и человека. Гены, следовательно, детерминируют поведенческие признаки через управление развитием нервной системы в онтогенезе.** Когда сложившаяся на основе генетической программы нервная система начинает функционировать, активация каких-либо генов для обеспечения специфичности этой функции не требуется. Можно сравнить эту ситуацию с реакцией свертывания крови. Все компоненты этой реакции возникают в результате функционирования генов, их кодирующих. Однако для того, чтобы после того, как вы порезали палец, свернулась кровь, активация этих генов не нужна (рис. 9.1).

Генетические способности к обучению у дрозофилы

Внимание к генетическим основам обучения у дрозофилы было привлечено уже упомянутыми выше работами Сэймура Бензера, и с этого момента накопился значительный фактический материал, касающийся данной проблемы.

В лаборатории Бензера удалось выработать у дрозофилы классический условный рефлекс на различные запаховые раздражители (ольфакторное обусловливание), в частности, 3-октанол (ОКТ) и 4-метилциклогексанол (МЦГ), один из них предъявляли вместе с ударами электрическим током в качестве безусловного раздражителя. Бы-

ло введено понятие индекс обучения (ИО), который отражал соотношения мух, избегающих запахов, сочетанный с электрическим током (УС+), и мух, избегающих запахов, не сочетавший с током (УС-). Если мухи неспособны обучаться, они избегают УС+ и УС- одинаково, и тогда ИО равен нулю ($1УС+ - 1УС- = 0$). Если все мухи избегают УС+ и не избегают УС-, то ИО равняется единице ($1УС+ - 0УС- = 1$). По данным группы Бензера индекс обучения у мух дикого типа равен $0,34 \pm 0,02$. Однако позднее американские генетики Тим Тули (Tully) и Дж. Квин (Quinn) сконструировали новый, усовершенствованный аппарат для выработки условного ольфакторного рефлекса и получили у мух дикого типа ИО $0,89 \pm 0,05$. Максимальный индекс обучения наблюдался при одновременном предъявлении условного (запах) и безусловного (ток) стимула, с увеличением интервала между ними индекс обучения уменьшался.

В группе Квина была исследована выработка инструментального условного рефлекса у дрозофилы. Для этой цели лапки двух мух были присоединены последовательно к цепи электростимулятора. Всякий раз, когда первая муха опускала лапку в солевой токопроводящий раствор, цепь замыкалась и обе мухи получали удар током. Постепенно первая муха научилась удерживать лапку и тем самым избегать удара током. Вторая муха служила "спаренным" контролем. Она получала электрические удары одновременно с первой мухой, но они не были связаны с ее собственным поведением, поэтому у нее инструментальный условный рефлекс (удерживание лапки над раствором) не вырабатывался. Оказалось, что по этому методу были способны обучаться 92% мух дикого типа.

Петербургские генетики Н.Г. Камышев, К.А. Илиади и другие исследовали возможность выработки у дрозофилы инструментального условного рефлекса по разработанной ими методике оперантного взаимобучения мух в групповой ситуации. Преимущество этой методики заключается в том, что исследованная форма обучения является естественной и имеет адаптивное значение. Дело в том, что в групповой ситуации, характерной для дрозофилы в местах естественного обитания, где мухи образуют скопления на подверженных брожению фруктах, излишняя их активность приводит к возрастанию частоты физических контактов между особями, в ходе которых мухи наносят друг другу удары лапками. Обмен взаимными ударами является как бы "наказанием" за проявленную активность и ведет к ее снижению в результате оперантного обучения, т.е. обучения методом проб и ошибок, при котором поведение животного, заканчивающееся получением вознаграждения или позволяющее избежать воздействия неблагоприятных факторов, становится более вероятным в дальнейшем, а вероятность поведения, которое приводит к отрицательным последствиям, снижается. Снижение активности уменьшает вероятность физических контактов и позволяет мухам не тратить время на агрессивные действия, а использовать его для удовлетворения более важных жизненных потребностей. В качестве критерия взаимного обучения мух в групповой ситуации рассматривается усугубление со временем различий между одиночными особями и мухами в группе по времени, прове-

денному в активности, и по некоторым другим параметрам двигательного поведения.

В силу хорошей генетической изученности дрозофилы на ней удобно исследовать молекулярно-генетические основы процессов обучения и памяти. Работы, начатые в этом направлении С. Бензером, были в дальнейшем развиты во многих лабораториях и привели к выявлению целого ряда соответствующих мутантов, затрагивающих молекулярные признаки.

Одним из первых был обнаружен ген *dunce* (*dnc*), локализованный в X-хромосоме, в области 3D4. Мутанты по этому гену имели очень низкий индекс обучения при использовании ольфакторной методики Бензера. Оказалось, однако, что при положительном подкреплении раствором сахарозы он был близким к норме, но мутантные особи более чем в 25 раз быстрее забывали приобретенный навык по сравнению с мухами дикого типа.

В последующем ген *dunce* (*dnc*) был идентифицирован как ген, кодирующий фосфодиэстеразу II (ФДЭ-II), которая расщепляет цАМФ (циклический аденозинмонофосфат).

Мухи с делецией по кодирующему эту ФДЭ району 3D4 характеризуются в 2–7 раз более высоким уровнем цАМФ по сравнению с мухами дикого типа. Было получено несколько мутантов по гену *dunce* и с помощью комплементационного анализа выявлено шесть аллелей этого локуса с разным уровнем ФДЭ-II.

Ген *dunce* – один из самых больших идентифицированных у дрозофилы и занимает около 140 кб. В результате альтернативного сплайсинга и процессинга им продуцируется по крайней мере 8–10 молекул РНК размером от 4,2 до 5,9 кб. Один из интронов этого гена необычно велик – 79 кб, внутри него содержится по крайней мере 2 других гена (*Sgs-4* и *Pig-1*). Первый из них кодирует один из белков слюнной железы и экспрессируется в этом органе в личиночный период жизни. Второй также экспрессируется в слюнной железе, но транскрипция его осуществляется в противоположном направлении. Продукт гена *dunce* имеет гомологию с ФДЭ других организмов, в то же время в этом локусе присутствует также последовательность, гомологичная гену, кодирующему гормон яйцекладки у моллюска аплизии, что, вероятно, объясняет его плейотропный эффект на процессы репродукции дрозофилы.

Ген *dunce* экспрессируется в грибовидных телах мозга дрозофилы. Известно, что у *Drosophila melanogaster* каждое из двух грибовидных тел содержит около 2500 нейронов, посылающих свои дендриты в вентральную к перикариону нейропил, где расположены нервные отростки от антеннальных долей и у некоторых насекомых из зрительной и других сенсорных систем. Очевидно, грибовидные тела получают информацию из антеннальных долей через их дендриты, локализованные в *salux* – области мозга, вентральной к грибовидным телам. Предполагается на этом основании, что грибовидные тела насекомых являются неким аналогом гиппокампа позвоночных.

Мартин Гейзенберг (М. Heisenberg) выявил важную роль грибовид-

ных тел в процессах поведения и обучения у дрозофилы, благодаря получению ряда мутантов с измененной морфологией этой структуры (рис. 9.2):

1. *vacuolar pedunculi*^{KS67}, *var* (54,2 ± 1). Вакуолизация этой структуры и гибель внешних нейронов в области ножек.

2. *beta-lobes-fused*^{BG17b}, *bef*. Грибовидные тела характеризуются архаичной структурой – слиянием их в вентральной области. У мух этой линии нарушен фототаксис, по-видимому, за счет аномалий в развитии глаз и оптических долей.

3. *Mushroom body defect*^{KS63}, *mud* (50 ± 3). В этом случае антеннальные доли и *tractus olfactorio globularis* сильно расширены. На стороне *calyces* найдено огромное количество очень тонких волокон, формирующих своеобразные дольки снаружи от главного церебрального нейропиля, но связанных с ним *tractus olfactorio globularis* и другими волокнами. Форма центрального комплекса часто искажена. Грибовидных тел не обнаружено.

4. *Mushroom bodies deranged*^{KS65}, *mbd* (56 ± 5, проксимальная часть X-хромосомы). Развивается только немного волокон, некоторые из них со стороны ножек (*pedunculi*) утолщены. Долек (*lobes*) не было обнаружено. *Calyces* существенно укрупнены, внутренние волокна разрастаются, но не вступают в церебральный нейропил, аккумулируясь вблизи *calyces*. Грибовидные тела у мутантов развиваются нормально на эмбриональной и личиночной стадии. Однако в течение первых часов развития куколки 60% составляющих грибовидные тела волокон клеток Кеньона у мутантов дегенерирует.

5. *Mushroom body miniature* (*mbm*) – 21B-C1. У этих мутантов грибовидные тела нормально развиваются до третьей личиночной стадии, когда волокна клеток Кеньона исчезают, несмотря то, что тела самих клеток остаются живыми. В дальнейшем в процессе метаморфоза и у имаго грибовидные тела уменьшаются или исчезают вообще. Проявление мутации зависит от пола – мутация влияет только на грибовидные тела самок, тогда как у самцов они остаются нормальными.

Мутантный фенотип весьма вариабелен, так что дефект может быть выражен в разной степени, а иногда проявляется только на одной стороне. Поведение и способности к обучению таких мух не коррелировало со степенью анатомических дефектов. Проведенные Гейзенбергом эксперименты показали, что у мутантных животных нет



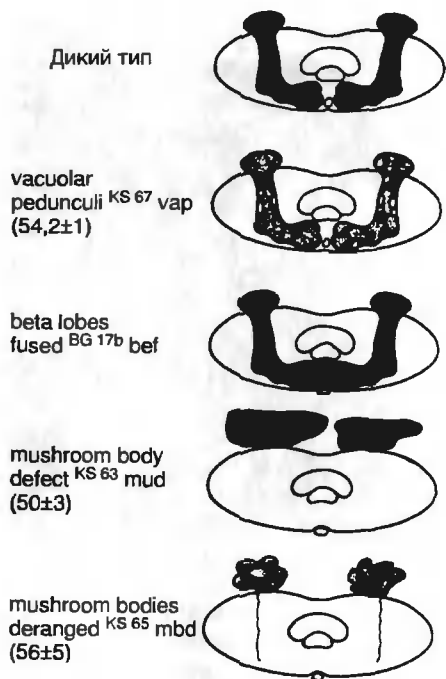


Рис. 9.2. Изменения строения грибовидных тел у мутантов дрозофилы. По Гейзенбергу.

нарушений моторной координации и, следовательно, для осуществления этой функции нервной системы грибовидные тела не являются ключевым компонентом. Не столь существенно их наличие и для выполнения ритуала ухаживания. Достаточно успешно справлялись мутантные мухи и с выполнением других поведенческих, в том числе и связанных с обучением, тестов. Гейзенберг предполагает связь грибовидных тел с более сложными формами поведения и, в частности, с ассоциативным ольфакторным обусловливанием.

Так, у мутантов *mbm* и *mbd* обнаружены дефекты только ольфакторного обучения. При этом дефект обучения не зависел от выраженности морфологических аномалий и не был связан ни с уменьшением чувствительности к запахам или электрическому току, ни с изменениями двигательной активности.

Грибовидные тела у перепончатокрылых (*Hymenoptera*, муравьи, осы, пчелы) особенно большие, что отражает их важность в поведении и памяти, связанными с социальным поведением. Считается, что в процессах запоминания у насекомых принимают участие и другие отделы мозга – в первую очередь антеннальные доли, центральный комплекс и латеральный протоцеребрум.

В грибовидных телах экспрессируются и еще один ген, *rutabaga* (*rut*), выделенный примерно в то же время, что и *dunce*, и локализованный в области 12F5-7. Этот ген, в противоположность предыдущему, кодирует продукт, ответственный за синтез цАМФ – каталитическую субъединицу Са/кальмодулин-зависимой аденилатциклазы (АЦ, Rut-AC). Rut-AC не активируется моноаминами – дофамином, серотонином или октопаминаом, но активируется нейропептидом PACAP, о котором речь ниже. Гомозиготные *rut/rut* животные утрачивают функцию АЦ и полностью лишены способности к ольфакторному обучению, тогда как у гетерозигот *rut/+* они лишь слегка ухудшены. Как и в случае с предыдущей мутацией, мутанты *rut* обнаруживают практически нормальные способности к обучению с пищевым подкреплением, но забывают приобретенный навык в 25 раз быстрее нормальных мух. Ген *rut*, как *dunce*,

экспрессируется в клетках calyces и lobes грибовидных тел. Все эти данные свидетельствуют о важной роли грибовидных тел как центров ольфакторной памяти.

Позднее был обнаружен ген *turnip* (*tur*), локализованный в проксимальной части X-хромосомы и кодирующий белок, который регулирует уровень активности протеинкиназы С (ПК-С). У гомозиготных по этой мутации мух найден очень низкий уровень активности этого фермента. Мутант *turnip* обнаруживает дефект в фосфолировании мембранного белка pp76, локализованного в ткани мозга. Способность к обучению и память нарушены у них таким же образом, как и у мух *dnc/dnc* и *rut/rut*. У них нарушены ольфакторная дискриминация, обучение личинок, зрительное обучение, формирование различных типов условных рефлексов.

Поведенческие особенности мутантов *amnesiac* (*amn*) (по гену, локализованному в зоне 19A1 X-хромосомы), при тестировании их по методике ольфакторного обучения отличаются от перечисленных выше мутантов. Мухи *amn/amn* имеют близкий к норме индекс обучения, но в течение первого часа после обучения быстро забывают приобретенный навык. Очевидно, данная мутация влияет на начальную фазу формирования следа памяти (энграммы). Сходные данные были получены на этих мутантах и при тестировании их при оперантном обучении, обучении на зрительные раздражители, обучении с положительным пищевым подкреплением, обучении, основанном на половом поведении, а также при обучении личинок. Оказалось, что ген *amnesiac* кодирует нейропептид, гомологичный питуитарному активирующему аденилатциклазу пептиду (РАСАР38) млекопитающих. РАСАР является членом семейства полипептидных гормонов, включающих секретин, глюкагон и вазоактивный интестинальный полипептид (VIP). У млекопитающих он экспрессируется в различных периферических тканях и в некоторых областях мозга, в частности в гипоталамусе и гиппокампе (имеющем прямое отношение к процессам обучения и запоминания). РАСАР в ходе своего функционирования взаимодействует с двумя типами трансмембранных рецепторов: 1) с рецептором, сцепленным с аденилатциклазой, который узнает также VIP, 2) с рецептором, который узнает только РАСАР и сцеплен с фосфолипазой С и аденилатциклазой. В нейронах РАСАР увеличивает содержание внутриклеточного сАМФ (циклический аденозинмонофосфат) и кальция, а также способствует росту аксона. Пептиды обычно освобождаются из нервных терминалей во время высокочастотной нейронной активности как контрансмиттеры (ко-медиаторы) вместе с такими медиаторами, как глутамат или серотонин. Молекулы медиаторов имеют малый размер и потому быстро действуют и быстро удаляются из синаптической щели. В противоположность им пептиды характеризуются продленным действием, отчасти потому, что они не подвержены действию деградирующих систем синаптической щели. Наконец, малые молекулы медиаторов синтезируются и “упаковываются” в маленькие пузырьки (везикулы) в пресинаптических терминалях, в то время как пептидные трансмисмиттеры синтезируются в рибосомах перикариона (клеточного тела) как часть неак-

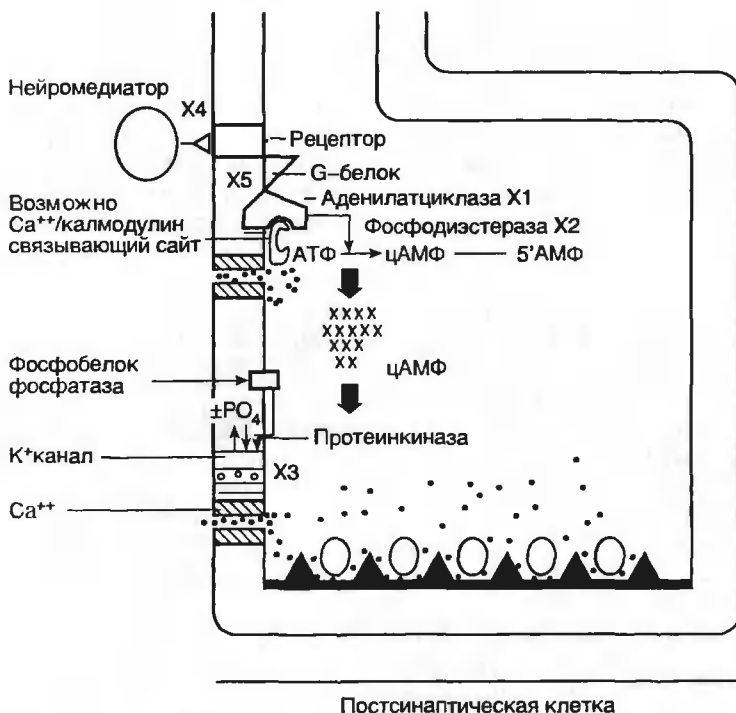


Рис. 9.3. Нейрохимическая модель ассоциативного обучения.

Мутации дрозофилы, дефектные по обучению и памяти – *rutabaga* (X1), *dunce* (X2), *Shaker* (X3) – действуют соответственно на аденилатциклазу, фосфодиэстеразу и белки калиевого канала. Предполагается, что мутация *tinrip* (X4) может быть вовлечена в cAMP-каскад через пока еще неизвестные изменения активности протеинкиназы С. Мутанты *Ddc* (X5) не синтезируют нейромедиатор (серотонин или дофамин), который необходим в ассоциативном обучении. По Kandel, Abel, 1995.

тивного белкового предшественника, который затем дробится на более мелкие активные формы, транспортирующиеся в больших пузырьках в нервные терминалы. В качестве ко-трансмиттеров пептиды, как правило, усиливают эффект первичных медиаторов, однако могут оказывать и некоторые отличные модулирующие действия. Белок *amnesiac* потенциально включает три пептида, два из которых гомологичны PACAP и, по всей вероятности, так же способствуют увеличению cAMP путем активации аденилатциклазы посредством взаимодействия с G-белком (рис. 9.3, 9.4). Все эти данные свидетельствуют о важной роли cAMP системы в процессе обучения и памяти, обнаруженной не только у дрозофилы, но и моллюсков (аплизия) и у мыши. У *Aplysia* cAMP требуется для замыкания синаптической связи между сенсорными и моторными нейронами в ходе обучения рефлексу втягивания жабер.

PACAP38-подобный белок дрозофилы индуцирует 100-кратное увеличение потока K⁺, это увеличение элиминируется у мутантов *rut*, а

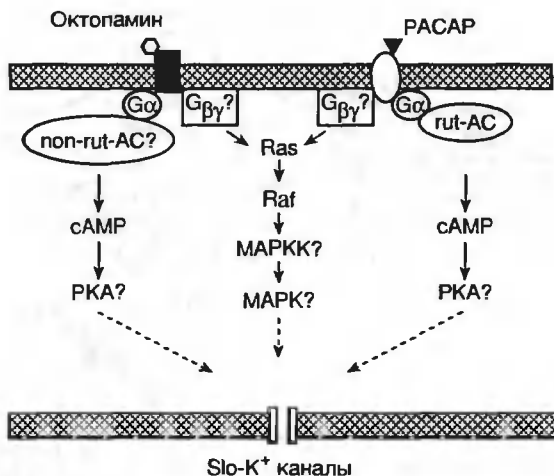


Рис. 9.4. Модуляция потока ионов калия посредством октопамина и PACAP38-подобного нейропептида.

Вопросом помечены те молекулы, функции которых не были тестированы в PACAP38 индуцированной модуляции. Пунктирные стрелки показывают, где cAMP и Ras/Raf пути конвергируют. Направляются ли они прямо к калиевым каналам или через промежуточную мишень – предстоит выяснить. По Kandel, Abel, 1995.

также *ras* и *raf* (гомологичные протоонкогенам). Оно однако имеет место в случае активного *raf* и добавлении cAMP. Из этого следует не только то, что RUT-AC активируется нейропептидом, но и то, что путь Ras/Raf существен для нейротрансмиссии.

Важную роль в описываемой цепи событий играет также и октопамин, нейротрансмиттер насекомых, присутствующий в нейромышечном соединении. Октопамин также индуцирует 100-кратное увеличение потока K^+ , но не через Rut-AC или Ras/Raf пути: октопамин-индуцированный ответ нормален у *rut* мутантов. На основе этих результатов и была предложена модель, представленная на рис. 9.5. Видно, что оба пути – и обусловленный PACAP38-подобным пептидом и индуцированный октопамином Ras/Raf – осуществляются посредством взаимодействия с G-белками, так что каждый трансмиссер активирует различные типы аденилатциклазы через субъединицу G-белка. Оба коактивирующих пути модулируют поток K^+ синергично. При этом вы является включенность Ras/Raf пути в процессы обучения и памяти. Молекулярный анализ больших нейрофиброматозом выявил возможность участия в этом пути гена нейрофиброматоза NF-1. Около 30% пациентов обнаруживают специфические расстройства способностей к обучению. У дрозофилы трансмиссия, вызванная PACAP38-подобным нейропептидом, элиминируется мутациями NF1-гомологичного гена.

Таким образом, можно считать, что нейропептиды, кодируемые *amnesiac*, принадлежат к числу модуляторов, высвобождаемых у дрозофилы безусловным стимулом (электрический шок) и активирующих

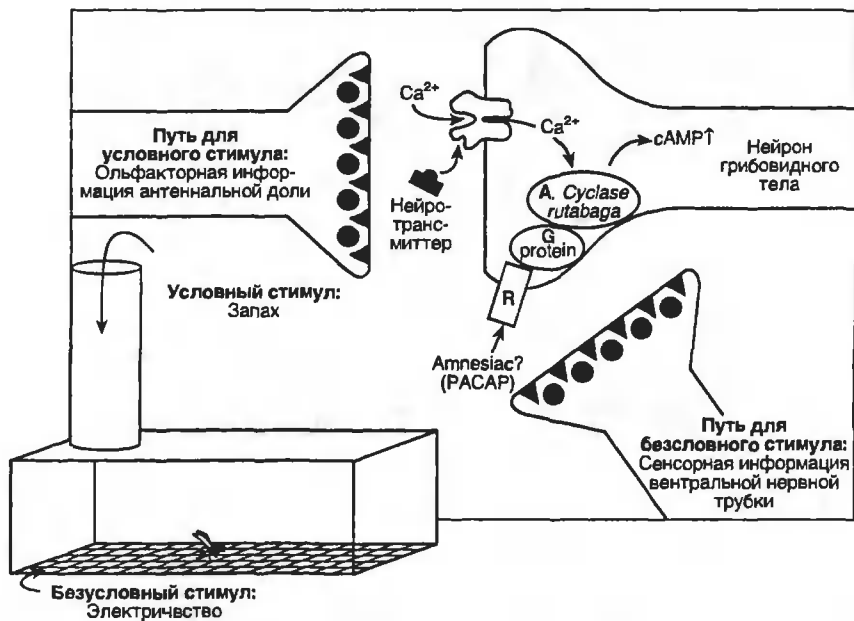


Рис. 9.5. Возможная модель ольфакторного обусловливания у дрозофилы. Ольфакторная дискриминация обучения. Запах сочетается с электрошоком.

циклазу через G-белок, в то время как поток Ca^{2+} , вызванный активностью нейронов, вовлеченных в пути условного стимула (например, ольфакторного пути) активирует циклазу через Ca^{2+} зависимый кальмодулин. Очевидно также, что усиливающие (безусловные) стимулы активируют моноаминэргические или пептидэргические модуляторные системы, и это вызывает функциональные изменения в пути условного стимула посредством активации сАМФ каскада. Дофамин, связывающийся с D1/D5 рецепторами, которые сцеплены с аденилатциклазой, является одним из молекулярных факторов, формирующих энграмму в префронтальной коре и гиппокампе млекопитающих. Следовательно, молекулярно-генетическая система, связанная с синтезом и распадом сАМФ является универсальным механизмом, принимающим участие в формировании энграммы. Это не означает, однако, что другие молекулярные системы не участвуют "на равных правах" в процессах запоминания.

Российский генетик (петербургской школы М.Е. Лобашева) Е.В. Саватеева открыла еще одну интересную мутацию, названную ею *agnostic* (*agn*) (район 11В X-хромосомы). Эта мутация температурочувствительна: при перmissive температуре (22°C) она повышает способности мух к обучению, а при restrictive температуре 29°C ведет к полной неспособности к обучению. На молекулярном уровне она вызывает повышение активности аденилатциклазы и кальмодулин-стимулируемой фосфодиэсте-

разы. Можно предположить, что ген *agn* ответствен за продукцию белка, контролирующего содержание кальмодулина. Одна из мутаций *agn* вызывает структурные дефекты в области центрального комплекса мозга.

Нарушения памяти наблюдаются также при мутациях генов *latheo*, *linotte*, нарушающих процесс приобретения навыка, а также *radish* и *cabbage*. Например, мухи с X-сцепленной мутацией *radish* сначала успешно выполняют тесты ольфакторной дискриминации, но затем быстро забывают приобретенные навыки. Резистентная к анестезии так называемая консолидированная память сильно редуцирована у мух с фенотипом *radish*, подтверждая, что этот ген включен в процесс консолидации (закрепления, перехода из краткосрочной в долгосрочную) памяти. Продукт гена *latheo* взаимодействует с тирозингидроксилазой, что предполагает модулирующую роль этого гена в синтезе нейротрансмиттера.

У дрозофилы известны также мутации, нарушающие поведенческие акты и ухудшающие память в связи с дефектом в синтезе нейромедиаторов. Это, в частности, мутации гена, кодирующего допа-декарбоксилазу (*Dopa-decarboxylase Ddc – 37B10-37D1*), фермент, который превращает L-DOPA в дофамин и 5-гидрокситриптофан – в серотонин. Эта мутация нарушает развитие мух, поэтому в работах по обучению животных используют температурочувствительные аллели. Гомозиготные по таким аллелям мухи при рестриктивной температуре не синтезируют дофамин и серотонин. Поскольку дофамин и серотонин важны для нормального осуществления ассоциативной формы обучения, у мутантов этот вид обучения нарушен.

Одним из самых первых обнаруженных мутантов, затрагивающих поведение дрозофилы, был *Shaker (Sh) – 58.1*, который в настоящее время уже клонирован. Мухи с этой мутацией проявляют повышенную частоту подергивания лапками в состоянии эфирного наркоза. Подобный эффект обусловлен изменением возбудимости мембраны аксона, обнаруженным с помощью электрофизиологических экспериментов. Данная мутация затрагивает структурные гены, кодирующие белки калиевых каналов. При изменении дозы генов соответственно изменяется число ионных каналов в мембране аксона. При выработке условного оборонительного рефлекса на ольфакторные раздражители было найдено, что мутанты *Sh* плохо обучаются и быстро забывают.

Предпринимаются попытки исследовать взаимодействие различных генов в формировании системы, ответственных за процессы запоминания.

Известно, что память – сложный и многоэтапный процесс. Различают три вида памяти: **сенсорную**, сохраняющуюся очень непродолжительное время, **кратковременную (STM)** – необходимую для первичной обработки полученной информации и **долговременную (LTM)**, которая является хранилищем информации неограниченного объема и времени (рис. 9.6). Важным понятием является понятие о **консолидации** памяти, т.е. о переходе информации из лабильной фазы, кратковременной памяти в стабильную, долговременную память. Процесс консолидации памяти может быть нарушен различными агентами. В частности, если

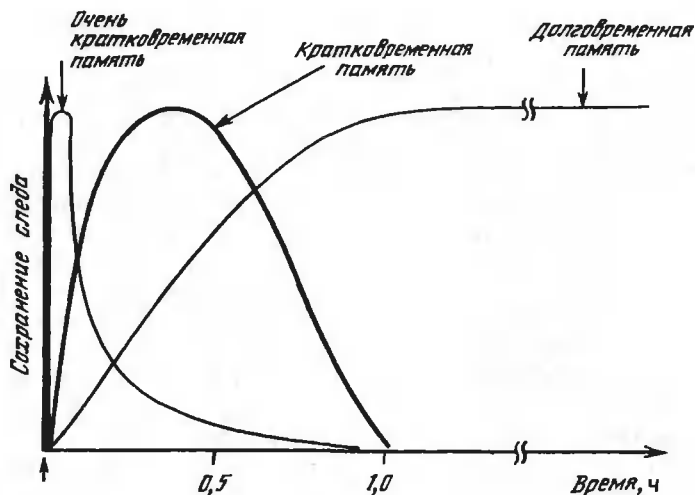


Рис. 9.6. Динамика следов памяти у цыпленка. По Мэри Гиббс.

сразу после выработки условного рефлекса подвергнуть экспериментальное животное воздействию электрошока или анестезии, то наступает частичная или полная потеря памяти (амнезия).

Оказалось, что разные гены ответственны за формирование разных систем, принимающих участие в организации последовательных процессов запоминания (рис. 9.7). Так, мутации *latheo* и *linotte* нарушают процесс обучения вообще. Мутации *dunce*, *rutabaga*, а также, возможно, *turnip*, влияющие на обмен цАМФ, вызывают дефекты кратковременной памяти (STM). Тим Тули (Tully) выделяет у дрозофилы еще и средневременную память (MTM), формирование которой зависит от STM. Этот вид памяти достигает максимального уровня через 60 минут после одного цикла обучения и сохраняется до 7 часов. MTM нарушается у мутантов *amnesiac*.

Дискутируется вопрос о том, является ли необходимым для процесса обучения синтез новых, специфических белков. Некоторые авторы полагали, что консолидация памяти зависит от этого синтеза и даже предполагали, что могут активироваться новые гены, ранее не функционировавшие. Однако убедительных экспериментальных доказательств в пользу этой точки зрения в опытах на пчелах и дрозофиле получено не было. Оригинальную концепцию выдвинул Тим Тули. Он выделил два независимых компонента консолидированной памяти. **Первый** сохраняется до четырех дней после окончания обучения, не зависит от белкового синтеза, блокируется мутацией *radish* и образуется при любом режиме выработки условного рефлекса (при однократном сочетании условного и безусловного стимулов, при отсутствии интервалов между многократными сочетаниями и при их наличии). Этот компонент обнаруживает нисходящий гради-

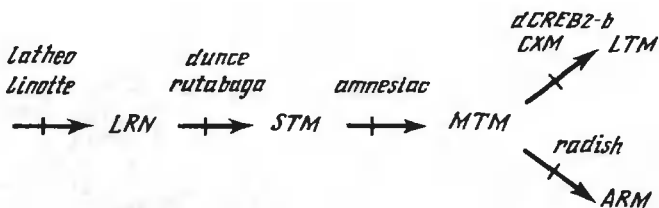


Рис. 9.7. Генетические пути, влияющие на формирование памяти в ходе павловского ольфакторного обучения у дрозофилы.

Избегание специфического запаха достигается после повторяющегося предъявления запаха вместе с электрошоком (LRN). Эта информация проходит затем через две функционально различные фазы, STM и MTM, когда она консолидируется в две параллельные формы долгосрочной памяти, ARM и LTM. LRN блокируется мутациями двух генов – *latheo* и *linotte*. LRN и STM нарушаются мутациями *dunce* и *rutabaga*. У мутантов *amnesiac* LRN и STM нормальны, но MTM ненормальна. У мутантов *radish* ARM нарушена, но LTM нормальна, в то время как LTM нарушена, а ARM нормальна у мух дикого типа, накормленных ингибитором белкового синтеза СХМ или у мух, экспрессирующих антагонист транскрипционного фактора CREB (*dCREB2-b*). По Tully et al., 1994.

ент чувствительности к анестетикам (холодовому наркозу) в ходе консолидации, но не чувствителен к ним после ее завершения, в связи с чем был назван устойчивой к анестетикам памятью (ARM). **Второй** компонент появляется только после многократных сочетаний условного безусловного стимулов при наличии достаточных интервалов (15 минут) между ними (такой режим Тим Тули применил впервые). Он сохраняется практически без изменений через семь дней после завершения обучения и не затрагивается мутацией *radish*. Формирование этого компонента консолидированной памяти полностью блокируется уже при 50%-ном подавлении синтеза белка путем скармливания мухам ингибитора белкового синтеза циклогексимида. Тули рассматривает этот компонент как истинную LTM в отличие от ARM. Имеются также данные, что консолидация LTM сопровождается цАМФ-зависимой транскрипцией генов. Однако нет данных, что это активация транскрипции каких-то новых, ранее не функционировавших генов, специфически работающих только в ходе запоминания. Скорее всего имеет место усиление транскрипционной активности уже функционировавших ранее генов в связи с возросшей физиологической нагрузкой, что представляет собой обычное явление. Известно, что цАМФ усиливает транскрипцию генов раннего действия (*c-fos*, например) посредством цАМФ зависимой протеинкиназы А, которая в свою очередь активирует CREB [cAMP-responsive element (CRE) – binding] белок в ядре клетки, являющийся фактором транскрипции (рис. 9.8).

Роль CREB в процессах обучения была детально исследована американскими генетиками. CREB принадлежит к суперсемейству так называемых leucine-zipper транскрипционных факторов. Лейцин-зипперовый домен опосредует селективное формирование гомо- и гетеро-

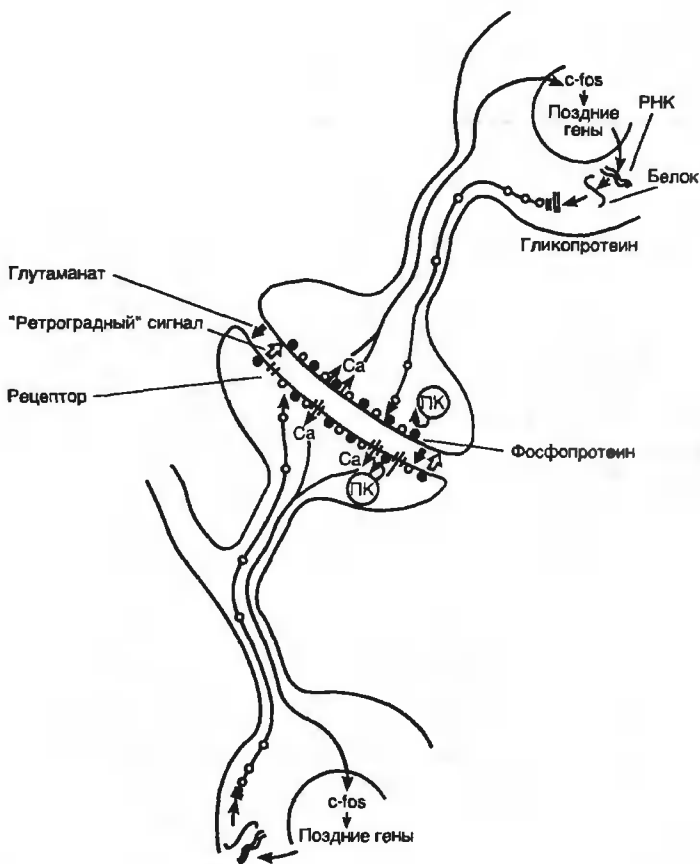


Рис. 9.8. Сигналы между синапсом и ядром.

На рисунке изображен синапс на шипике дендрита (без соблюдения масштаба), а также тела пресинаптического и постсинаптического нейронов. В процессе формирования памяти нейромедиатор (глутамат, показан черной стрелкой) освобождается из пресинаптического участка и взаимодействует с рецептором на постсинаптической клетке, что приводит к фосфорилированию мембранных белков (черные кружочки) протеинкиназой с (ПК) и поступлению внутрь клетки ионов кальция (Ca). Кальций служит сигналом для ядра, где начинается транскрипция "ранних" (c-fos) и "поздних" генов, которые кодируют синтез белковых и гликопротеиновых молекул (белые кружочки), а те в свою очередь транспортируются к мембране и включаются в нее, изменяя ее форму и размеры. Параллельно аналогичный процесс запускается под действием ретроградного сигнала (светлая стрелка) в пресинаптической клетке. По Роузу.

димеров среди молекул различных членов семейства. Связываясь с CRE-последовательностью ДНК, которую содержат в своей регуляторной части цАМФ-индуцируемые гены, димеры CREB активирует их транскрипцию. У дрозофилы был клонирован и изучен ген dCREB2, характеризующийся высокой степенью гомологии с факторами транскрипции CREB и CREM млекопитающих. В результате аль-

тернативного сплайсинга этот ген образует несколько продуктов, один из которых (dCREB-a) является активатором, а другой (dCREB-b) специфическим антагонистом цАМФ-индуцируемой транскрипции. С помощью генно-инженерной техники была сконструирована последовательность ДНК, транскрибирующая dCREB-b, под промотором гена теплового шока. У трансгенных мух, в геноме которых была введена эта конструкция, при повышенной температуре индуцировался интенсивный синтез белка dCREB-b. Применение теплового шока за 3 часа до обучения вызывало у трансгенных животных полную блокаду консолидации LTM, но не влияло ни на само обучение, ни на консолидацию ARM.

Сравнение продукта гена CREB дрозофилы и млекопитающих показало, что две области молекулы высоко консервативны: карбокситерминальная основная область – leucine zipper зона (область димеризации и ДНК-связывающая зона) и область внутреннего фосфорилирования. В ходе анализа домена фосфорилирования обнаружено, что множество аминокислотных остатков, являющихся субстратами действия киназ, – консервативны. Это, в частности, сайты фосфорилирования Са-кальмодулин киназой II, гликогенсинтаза киназой-3 и казеинкиназой, а также сАМР-зависимой протеинкиназой (сайт Ser-133). Эти киназы, возможно, реализуют ядерный уровень сигнала трансдукции, который активируется во время обучения и включен в регуляцию активности CREB. Активность CREB может быть ингибирована фосфорилированием СаМ киназой II консервативного Ser-142 остатка. Это “торможение” относится к активирующему фосфорилированию сайта Ser-133. Отсюда можно сделать вывод, что выполнение каждой пробы в ходе обучения (training trial) сопровождается активацией нейронов, включенных в LTM. В мозге дрозофилы они были идентифицированы и их оказалось немного. В них возникает Ca^{2+} поток, СаМ киназа II активируется, а CREB, соответственно, инактивируется. Периоды покоя в промежутках между пробами (trial) сопровождаются дефосфорилированием Ser-142, осуществляемым соответствующей фосфатазой, что разрешает активацию молекулы CREB, если остаток Ser-133 все еще фосфорилирован (рис. 9.9).

Таким образом, согласно Тиму Тули продукты генов *latheo* и *linotte* включены в ранние процессы запоминания. У мутантов *dunce* и *rutabaga* нарушены обучение и ранняя память, но ARM тем не менее проявляется, что свидетельствует об участии этих генов в STM. У мух с мутантным геном *amnesiac* обучение и STM близки к норме, но МТМ нарушена. Мутанты по гену *radish* нарушают ARM, оставляя интактной LTM. Циклогексимид нарушает LTM, но не оказывает существенного влияния на ARM.

Хотя молекулярно-генетические аспекты обучения во многом остаются неизвестными, в исследованиях на дрозофиле достигнуты, как мы видели, существенные успехи в этой области. Однако существует и еще один, пожалуй, более важный уровень обучения и запоминания, который реализуется прежде всего через взаимодействия различных групп нейронов, нейронных ансамблей и модулей. Молекулярные события

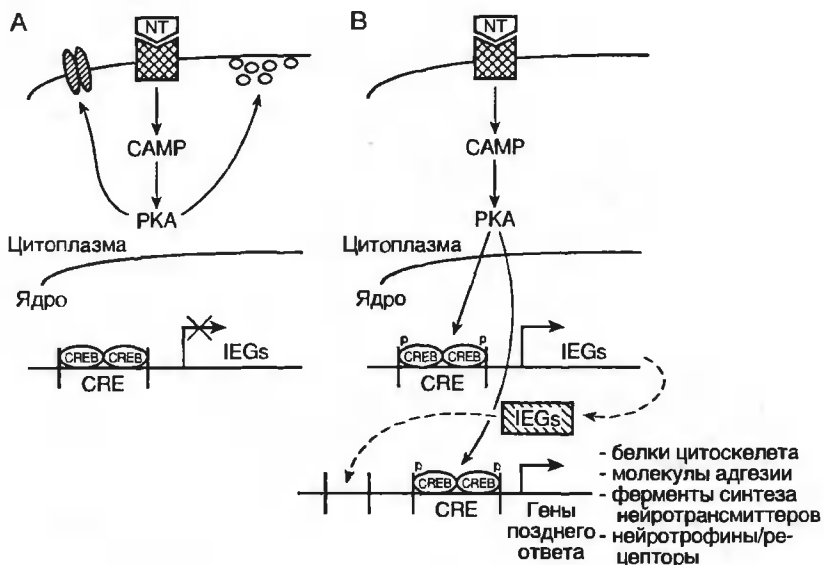


Рис. 9.9. Молекулярные механизмы краткосрочной и долгосрочной памяти
 А – краткосрочный контакт с нейромедиатором ведет к кратковременному накоплению сАМФ, что способствует активации PKA в цитоплазме и может обеспечить модификацию ионных каналов и синаптических функций. В – Долгосрочный контакт с нейромедиатором ведет к генерации повышенного количества сАМФ, что обеспечивает транслокацию в ядро каталитической субъединицы PKA. При этом фосфорилируется CREB и, таким образом, активируется транскрипция промежуточно-ранних генов (IEGs). Белковые продукты многих из этих генов сами являются транскрипционными факторами, которые могут активировать гены позднего ответа, действующие в кооперации с CREB. Гены позднего ответа кодируют белки, необходимые для долгосрочной модуляции синаптической функции. По Frank, Greenberg, 1994.

лишь как бы обслуживают этот уровень. У дрозофилы его изучать затруднительно в связи с малыми размерами нервных клеток, и поэтому основные результаты получены в экспериментах на птицах и млекопитающих.

Анализ процессов обучения и памяти у птиц

Когда мы приступаем к исследованию тех или иных функций, то прежде всего задаемся вопросом, какова их локализация, в какой части организма они осуществляются? Не является исключением и феномен памяти. Вполне естественно задать вопрос, в какой области мозга совершаются события, связанные с этим феноменом? Для того чтобы ответить на этот вопрос, был использован чрезвычайно остроумный метод. Известно, что активно функционирующие нервные клетки поглощают в больших количествах глюкозу: мозг получает энергию, сжигая глюкозу. Следова-

тельно, это вещество как бы маркирует те нервные клетки, которые принимают участие в осуществлении той или иной физиологической реакции, в частности обучения. Для обнаружения этих клеток в организм обучающегося тому или иному навыку животного вводят в кровяное русло радиоактивную меченую вещество, очень похожее на глюкозу, а именно 2-дезоксиглюкозу (2-дг). Нервную клетку, как бы обманывают во имя достижения вполне корыстных целей. Клетка на этот обман поддается и активно “вылавливает” аналог глюкозы из окружающей среды. Внутри клетки первый же из набора ферментов, расщепляющих глюкозу, тоже примет 2-дг за природный сахар и станет превращать ее в 2-дезоксиглюкозо-6-фосфат (2-дг-6Ф). Однако на следующем этапе метаболизма фермент, который должен был бы расщеплять глюкозо-6-фосфат, способен “узнать” подделку и не воздействует на 2-дг-6Ф. Последний накапливается в клетках, и его количество служит мерой того, сколько они используют глюкозы и, следовательно, в какой степени участвуют в осуществлении изучаемой функции. При этом можно с помощью сочетания гистологических и радиоавтографических методов выявить эти клетки и зарегистрировать те зоны мозга, которые функционально активны в процессе обучения. Значительные успехи были достигнуты с помощью этого метода в опытах с обучением цыплят.

Им подбрасывали бусинки, смоченные водой или горьким раствором (метилантранилат), причем те и другие были разного вида. Цыплята, естественно, клевали эти бусинки и после нескольких предъявлений обучались различать, какому виду соответствует горький вкус, который им, естественно, не нравился. Динамика следов памяти у цыпленка показана на рис. 9.10. Английский нейробиолог Стивен Роуз (S. Rose) с сотрудниками, используя упомянутую выше методику, задался целью выяснить, что же происходит при этом в мозгу подопытных животных. Оказалось, что два участка в мозге обученных цыплят при радиоавто-

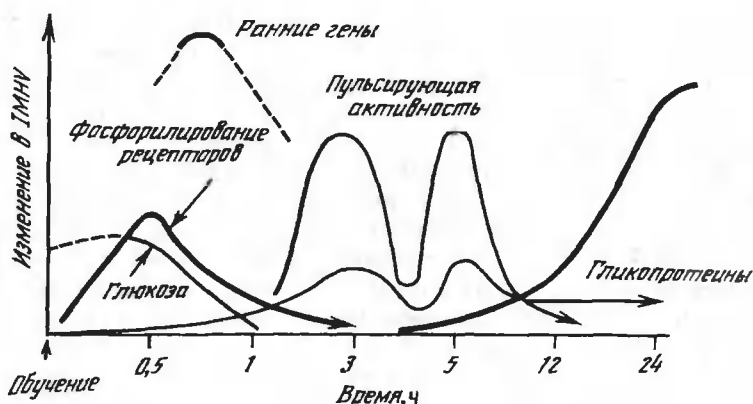


Рис. 9.10. Молекулярный каскад памяти.

Кривые схематически показывают последовательность молекулярных изменений, наблюдаемых в ИМНУ цыпленка в разные сроки после опыта с горькой бусиной. По Роузу.

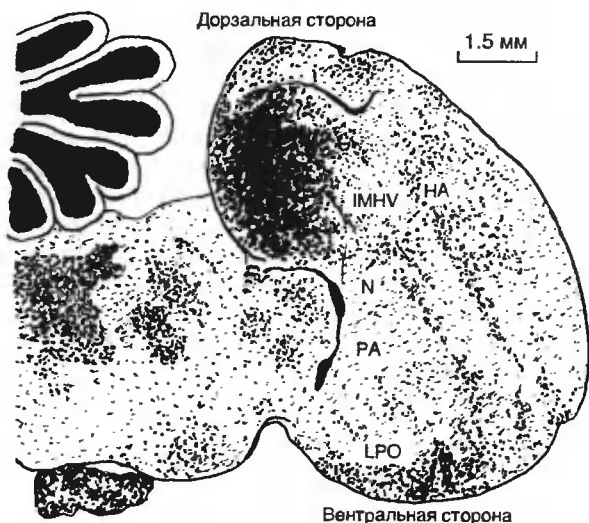


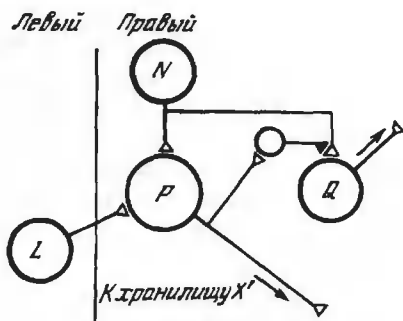
Рис. 9.11. Гистологический срез переднего мозга цыпленка.

На этой микрофотографии показано расположение *IMHV* и *LPO*. Другие отделы мозга: *HA* – hyperstriatum accessorium, *N* – neostriatum, *PA* – paleostriatum augmentatum. Темноокрашенная древовидная структура слева – мозжечок. По Роузу.

графическом анализе “светились” сильнее, чем у контрольных (рис. 9.11). Это – промежуточная часть медиовентрального гиперстриатума (Intermediate Medial Hyperstriatum Ventrale – *IMHV*) и *Lobus Parolfactorius* (*LPO*). При этом сразу после обучения содержание радиоактивной метки было особенно высоким в левом *IMHV* и левом *LPO*. Следовательно, несмотря на двустороннюю симметрию куриного мозга, состоящего, как и у млекопитающих, из двух внешне одинаковых полушарий, эффект обучения был **асимметричен: за обучение у цыплят в большей мере отвечало левое полушарие**. *IMHV* является аналогом ассоциативной коры млекопитающих, где сходятся и интегрируются сигналы от многих сенсорных систем. *LPO* координирует двигательные реакции, в том числе клевание, и имеет отношение к эмоциональным реакциям птиц, в частности, к чувству опасности и к ощущениям неприятного вкуса. Что же происходит в этих ядрах в ходе обучения? Прежде всего выяснилось, что в ходе обучения важную роль играют нервные клетки, вырабатывающие в качестве нейромедиатора (нейротрансмиттера) глутамат. В процессе формирования памяти глутамат освобождается из пресинаптического участка и взаимодействует с рецептором на постсинаптической клетке, что ведет к фосфорилированию мембранных белков протеинкиназой *C* и потоку ионов Ca^{2+} в клетку. Ионы кальция служат сигналом для ядра, где усиливается транскрипция сначала так называемых “ранних” генов (протоонкоген *c-fos*), а затем и “поздних” генов. Последние организуют повышение синтеза белковых и гликопротеиновых молекул, которые транспортируются к мембране

Рис. 9.12. Схема возможных нейронных взаимодействий, которые могут объяснить влияние левого ИМНВ на правый ИМНВ при формировании следов памяти.

Белые треугольники – возбуждающие синапсы, черный треугольник – тормозный синапс. Выходной сигнал клетки Q идет к другим нейронам в ИМНВ или к другим отделам мозга, возможно, к тем, которые регулируют поведение приближения–избегания. По Роузу.



и включаются в нее, изменяя ее форму и размеры. Сходный каскад событий включается под действием ретроградного сигнала и в пресинаптической клетке. Возможно, комплекс процессов такого рода и является молекулярной основой замыкания синаптической связи, функционального “прорыва” предсуществующих, сформировавшихся в онтогенезе синапсов, в результате чего формируются нейронные контуры – носители энграммы.

Что касается синаптического аппарата, то наряду с качественными, обнаруживаются и количественные изменения. Так, количество шипиков (образующих синапсы) на дендритах клеток ИМНВ через 24 часа после обучения увеличивается на 60%. Наблюдается и изменение их формы – раздувание кончика, что связывается с повышенным синтезом гликопротеинов. Сходная перестройка синапсов выявлена и в LPO. При повреждении ИМНВ цыплята клюют горькую хромированную бусину так же, как их ложно оперированные собратья, трясут головами, ощутив ее вкус, и отворачиваются при повторном предъявлении. Однако спустя несколько часов при вторичном испытании они полностью забывали приобретенный опыт и клевали сухую бусину столь же энергично, как и контрольные цыплята, которым раньше давали бусину, смоченную водой. Следовательно, повреждение мозга не влияло на поведение птенцов (клевание бусины), на чувство вкуса или общую подвижность – они лишь не помнили, что следует избегать бусин определенного вида. При повреждении только левого ИМНВ реакция избегания отсутствовала, а при правостороннем повреждении сохранялась, что согласуется с данными о функциональной асимметрии мозга (рис. 9.12).

Через час после обучения даже двустороннее повреждение ИМНВ не приводило к амнезии. Итак: для запоминания необходим интактный левый ИМНВ, но если цыплята уже усвоили навык, ИМНВ оказывается ненужным. Следовательно, след памяти переместился. Но куда? Оказывается, в LPO. Действительно, двустороннее повреждение LPO через час после обучения вызывало амнезию, которой не было при одностороннем правом или левом повреждении. Однако, если повредить LPO до обучения, такая операция не влияет на память. Очевидно, в этом случае память закрепляется в ИМНВ. Объяснить полученные результаты поз-

волила следующая серия экспериментов. Сочетанное повреждение LPO до тренировки и IMHV после тренировки вызывало амнезию. У животных с повреждением LPO во время обучения последующее повреждение левого IMHV не влияло на запоминание, а повреждение правого IMHV вызывало амнезию. Все эти результаты позволили Стивену Роузу построить модель **согласно которой первичный след памяти о бусине и реакции избегания образуется в левом IMHV, спустя несколько часов после обучения он “перемещается” сначала в правый IMHV, а затем в правый и левый LPO.**

Сходные явления были выявлены и при исследовании **импринтинга** – своеобразного варианта памяти. Особенно четко сформулировал понятие об этом явлении применительно к птицам К. Лоренц (Lorenz). Вскоре после вылупления птенцы выводковых птиц начинают следовать за матерью. Однако реакция следования вызывается не только истинной матерью. Например, цыплята домашних кур могут приближаться к самым различным объектам, в особенности к движущимся. Если цыплята подвергаются продолжительное время воздействию того или иного объекта, у них формируется привязанность к этому объекту, сравнимая с привязанностью к настоящей матери. Вблизи этого объекта они испытывают удовольствие и начинают боятся и сторониться других объектов. Подобное поведение свидетельствует о том, что они запоминают признаки “матери”. Таким образом, птенцовый импринтинг – **это процесс, посредством которого у молодых птиц формируется привязанность к матери или ее искусственной замене.** Импринтинг свойствен также некоторым зрелорождающимся (способным ходить и бегать через несколько часов после рождения) млекопитающим, в частности морским свинкам, овцам, козам и антилопам. Однако большая часть исследований этого явления проводилась на цыплятах. С помощью радиоавтографического метода (с использованием, однако, другой, нежели у Роуза, радиоактивной метки) было установлено, что импринтинг сопровождается активацией функционирования нервных клеток той же промежуточной части медиовентрального гипертриатума (IMHV), что и в опытах Роуза. Впрочем, эти данные впоследствии были подтверждены и в опытах с введением 2-дезоксиглюкозы.

Повреждения IMHV у цыплят нарушало импринтинг так же, как и другие виды памяти. Принято считать, что эта область мозга имеет критическое значение для хранения информации, имеющей прямое отношение к выработке навыка следования за матерью. Как и в опытах Роуза, была продемонстрирована функциональная асимметрия мозга: левый IMHV выполняет функцию хранилища памяти, а повреждение правого не отражается на процессе импринтинга. Точно так же, если повреждать IMHV через некоторое время после обучения, амнезии не наступает. Г. Хорн (G. Horn) предложил модель взаимодействия правого и левого IMHV, сходную с моделью Роуза и постулировал наличие хранилища памяти, соответствующее LPO на схеме Роуза.

Достаточно подробно изучались и морфологические основы импринтинга. Есть данные, что импринтинг влияет на дифференцировку

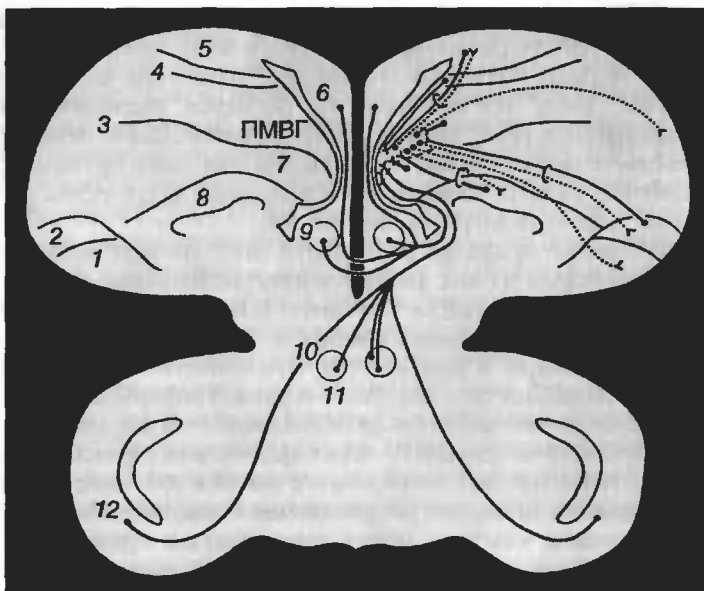


Рис. 9.13. Схема связей *IMHV*.

Афферентные пути обозначены сплошными линиями, эфферентные — точечными. Многие структуры, показанные на рисунке, не лежат в одной плоскости, а показанные пути не полностью соответствуют их действительному направлению. 1 — задняя область архистриатума, 2 — дорзальная область промежуточного архистриатума, 3 — латеральная область мозга, 4 — промежуточный гиперстриатум/дорзальный гиперстриатум, 5 — дополнительный архистриатум, 6 — гиппокамп, 7 — неостриатум, 8 — возвышающийся палеостриатум, 9 — септальные ядра, 10 — дорзо-медиальная область таламуса, 11 — вентромедиальная область таламуса.

нейронов передней части крыши переднего мозга. В частности, возрастает число шипиков на единицу длины дендрита, стимулируется формирование аксо-шипиковых синапсов.

Обучение видоспецифической песне у птиц сопровождается сложной перестройкой нервных сетей, регулирующих структуры, которые осуществляют пение. Система этих сетей включает высший вокальный центр мозга (HVC), Магноцеллюлярное ядро неостриатума (MAN), специфическое ядро архистриатума (RA), медиальное дрозолатеральное ядро таламуса (DLM), ядро 12-го черепного нерва (п. hypoglossus), ветви которого иннервируют вокальный аппарат. Замечательно, что в цепочке нервных связей $DLM \rightarrow MAN \rightarrow RA$ каждая субгруппа нейронов устанавливает контакты со строго определенной соответствующей ей субгруппой клеток, иллюстрируя лишний раз детерминистический принцип построения нервной системы. В ходе обучения увеличиваются размер нейронов и их количество в соответствующих областях мозга, увеличивается количество шипиков и синаптических контактов. Более сложные изменения свойственны клеткам магноцеллюлярного ядра. В

них количество синаптических связей уменьшается. Также уменьшается количество NMDA-рецепторов при увеличении их сродства к специфическому лиганду (МК-801). Очевидно, хотя количество синапсов уменьшается, "сила" тех синапсов, что остаются, увеличивается. Снижается активность гена, кодирующего синаптический белок синельфин, и соответственно снижается концентрация этого белка в MAN и в RA, последнее, видимо, связано с уменьшением количества синапсов, образуемых аксонами MAN на клетках RA.

В IMHV имеются клетки различного типа, упорядоченно расположенные. Некоторые из них являются интернейронами, остальные посылают аксоны к другим областям мозга. В IMHV выявлено также значительное число нейроактивных веществ, которые могут функционировать как медиаторы и модуляторы. Эта область получает отростки нейронов от большинства сенсорных систем. Информация, поступающая в эту область, предварительно обрабатывается в других сенсорных областях переднего мозга. IMHV через прямые или переключенные пути имеет доступ к выходам из переднего мозга и оказывает влияние на позу, локомоцию и зрительно направляемое поведение. Имеются также связи с системами, которые могут участвовать в организации таких форм поведения, как нападение, избегание и висцерально-эндокринные функции. Связи IMHV напоминают связи префронтальной и цингулярной областей коры головного мозга млекопитающих и приматов, которые также имеют отношение к памяти (рис. 9.13).

Анализ процессов обучения и памяти у млекопитающих

Молекулярно-генетический анализ обучения и памяти у млекопитающих обычно проводится на примере мышей и крыс. У обоих объектов уже давно были обнаружены межлинейные различия по способностям к обучению. Здесь сыграло роль то обстоятельство, что было создано достаточно много инбредных линий мышей, а также накоплена информация о нейрологическом и поведенческом созревании этого вида, в общих чертах напоминающем таковое у человека. Вдобавок было определено существование четких внутривидовых фенотипических различий на уровне мозга, что указывало на большую индивидуальную изменчивость массы мозга и размеров некоторых церебральных структур, уровней содержания холинергических и адренергических медиаторов, а также электроэнцефалографического рисунка. При использовании метода выработки условного рефлекса избегания были выявлены значительные межлинейные различия. Итальянский генетик Оливеро (Oliverio) исследовал реакцию избегания у мышей, полученных в результате 8-линейного скрещивания (скрещивания, проведенного между восемью различными линиями F/J, A/HeJ, BALB/cJ, C57BL/6J, C57L/J, C57BR/cdJ, DBA/2J, SEC/1ReJ). Животные из F1, происходящие из различных родительских линий, спаривались для получения 4-линейного скрещивания, эти потомки, уже имеющие общих родителей какой-то одной линии, спаривались для получения 8-линейного скрещивания. Поведенческая гетерогенность этих мышей выражена достаточно отчет-

ливо. Оливерии установил также, что одни те же гены могут быть ответственны за различные поведенческие признаки, что дает возможность изучать влияние данного конкретного гена на поведение путем замены одной его аллели на другую при неизменности остального генотипа, а также с помощью методов молекулярной генетики анализировать механизмы этого влияния. Так, мыши линий DBA/2, PT, Re/Re наиболее способны к обучению условному рефлексу избегания, в то время как мыши линий C57L, CC7BR, tf/tf тестируются по этой методике как "глупые". В лаборатории Корочкина обнаружена корреляция между способностью к обучению и содержанием S-100 белка в мозге мышей. Чем мыши способнее, тем выше содержание этого белка.

Были предприняты попытки охарактеризовать исходный уровень транскрипции и трансляции, а также их изменения в процессе обучения у животных с генетически детерминированными формами поведения. Так, в лаборатории Хольгера Хидена был проанализирован синтез специфического белка нервной ткани 14-3-2 (изофермент энолазы) у двух крыс Wistar, селекционированных в течение 16 поколений инбредных скрещивания и различающихся по скорости выработки условного рефлекса избегания.

Оказалось, что у линии быстро обучающихся крыс увеличена скорость включения радиоактивных предшественников H^3 - и C^{14} -валина в этот нейроспецифический белок по сравнению с контрольными животными из той же линии в четырех важных областях мозга: сенсорной и зрительной коре, гиппокампе и энторинальной коре. У крыс медленно обучающейся линии подобные различия не были обнаружены. Вероятно, найденные изменения в уровне содержания энолазы являются маркерами интенсивного функционирования тех или иных нейральных контуров (модулей), принимающих участие в обучении.

Выдающийся эмбриолог А.П. Дыбан вместе с И.И. Полетаевой и Л.Г. Романовой обнаружили, что изменения в распределении генетического материала, в частности, робертсоновские транслокации (РТ) также могут отражаться на особенностях поведенческих реакций.

Робертсоновские транслокации – это центрические или тандемные слияния двух акроцентрических хромосом с образованием одной метацентрической или субметацентрической. При РТ, по сравнению с другими типами хромосомных перестроек, не происходит заметных изменений в количестве генетического материала, но изменяется лишь положение отдельных групп генов в геноме.

Тестирование большого числа животных с РТ позволило выявить особей, у которых доля правильных решений поведенческой задачи достоверно превышала случайную. Это были мыши с РТ (слиянием) 8-й и 17-й хромосомы – Rb (8,17) Pem. В течение более чем двадцатилетнего разведения в лаборатории мышей с этой хромосомной мутацией устойчиво обнаруживали отличный от случайного уровень решения задач на экстраполяцию. Позднее были получены сублинии известных инбредных линий (CBA и C57BL/6J, в кариотипе которых имелась данная РТ).

В последнее время внимание нейрогенетиков и нейрофизиоло-



Андрей Павлович Дыбан. Выдающийся российский эмбриолог. Исследовал роль отдельных хромосом в развитии млекопитающих, является пионером в приложении принципов генетики развития и цитогенетики к нейрогенетическим исследованиям.

гов приковано к глутаматэргическим нервным клеткам, поскольку именно с нейронами данного типа эргичности связываются у млекопитающих, как и у птиц, процессы обучения и запоминания.

Особенно большое значение придается рецептору NMDA, с которым связывается глутамино-

вая кислота. Молекулы этого рецептора расположены на поверхности клетки и, как предполагается, играют ключевую роль в обучении и памяти. Существует несколько подтипов глутаматных рецепторов. Их классифицируют на основе изучения действия аналогов глутамата: N-метил-D-аспартата (NMDA), альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовой кислоты (AMPA), каиновой кислоты, квискваловой кислоты. Обычно выделяют два главных типа рецепторов – NMDA и не-NMDA-рецепторы. К не-NMDA-рецепторам относятся рецепторы AMPA и каиновой кислоты, сходные по своим физико-химическим свойствам и распространенности в структурах мозга.

В мозге млекопитающих NMDA-связывающие участки локализованы главным образом в кортикальных структурах, базальных ганглиях и сенсорно-ассоциативных системах. Наивысшая их плотность обнаружена в гиппокампе. NMDA-рецепторы состоят из ряда субъединиц и легко олигомеризуются, образуя высокомолекулярные комплексы. Эти белки являются гликопротеид-липидными комплексами, которые формируют ионные каналы для катионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . Молекула глутаматного рецептора содержит большое количество гидрофобных аминокислот, связанных и с внутренней, и с внешней частью мембраны, организующие взаимодействие с липидами.

Рецептор имеет пять функционально различных участков:

- 1) участок связывания нейромедиатора;
- 2) регуляторный глициновый участок;
- 3) участок внутри канала, связывающий фендицилин и родственные соединения;
- 4) потенциал-зависимый Mg^{2+} -связывающий участок;
- 5) тормозный участок связывания двухвалентных катионов.

Наиболее специфический синтетический агонист этих рецепторов – NMDA – не обнаружен в мозге. Считается, кроме глутамата эндоген-

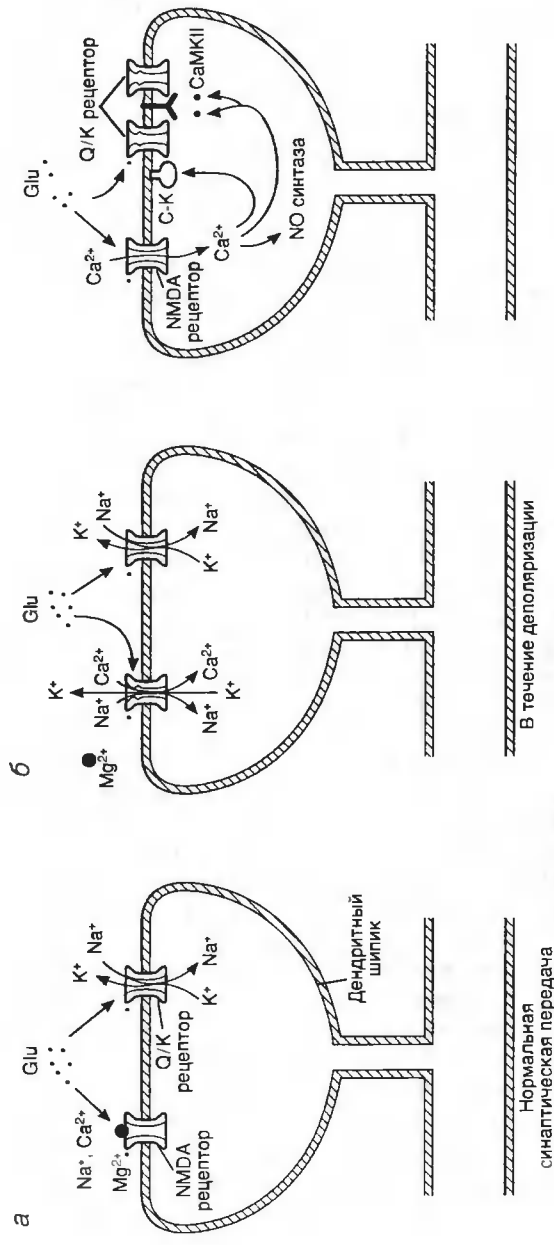


Рис. 9.14. Индукция ЛТР.

a – схематическая диаграмма роли NMDA рецепторов. Глютамат высвобождается из пресинаптических терминалей и связываются как с N-метил-D-аспартатными (NMDA), так и с квансудат/каинатными (Q/K) рецепторами. Ионы натрия и калия текут через Q/K рецепторный канал, но не через NMDA рецепторные каналы, поскольку ионы магния блокируют канал (слева). Когда терминаль деполаризуется (справа) и в ходе высокочастотного тетануса магнийевый блок снимается, "разрешая" ионам калия, натрия и кальция течь через NMDA канал. Повышение содержания ионов кальция, возникающее в дендритном шипике, является необходимым триггером для последующих событий, ведущих к ЛТР.

б – схематическая диаграмма постсинаптических мишеней для ионов кальция, которые могут способствовать индукции ЛТР. СаМ киназа II концентрируется в постсинаптическом утолщении, в то время как С-киназа движется к мембране. Активность обеих киназ необходима для генерации ЛТР, киназы могут фосфорилировать мембранные белки, что ведет к генерации ЛТР. Другие возможные мишени для ионов кальция включают фосфолипазу А, кальпаин (кальций-зависимая протеаза), и NO-синтазу. А – по Nicoll et al., 1988. В – по Kennedy, 1989.

ными медиаторами в этих рецепторах являются L-аспарат и L-гомоцистеинат. Среди антагонистов рецепторов NMDA типа выделяют D-2-амино-5-фосфоновалериат и D-2-амино-7-фосфоногептаноат, а также синтетические 3-(2-карбоксихиперазин-4-ил)-пропил-L-фосфонат, МК-801 и др., являющиеся неконкурентными ингибиторами NMDA, которые не действуют непосредственно на участки связывания глутамата. Глициновый участок способствует усилению ответа NMDA-рецептора в случае соответствующего влияния глицина. Сам глицин не вызывает ответа, но увеличивает частоты открывания канала, не влияя на амплитуду тока при действии агонистов NMDA. Наличие глицина вообще необходимо, поскольку при полном его отсутствии рецептор не активируется L-глутаматом.

Важнейшей функцией NMDA-рецептора в ЦНС является **управление ионным каналом**, его способностью пропускать ионы натрия, калия, кальция. При этом внутриклеточный кальций, концентрация которого возрастает при активации рецепторов NMDA, вовлечен в инициацию процессов пластичности развивающегося и взрослого мозга (рис. 9.14).

В то же время группами Эрика Канделя (Eric Kandel) и Сусуму Тонегавы (Susumu Tonegawa) было показано, что NMDA-рецептор функционирует во взаимодействии с еще одним важным фактором – альфа-кальций-кальмодулин-зависимой киназой II (CaMKII). Когда глутамат высвобождается из пресинаптической области и связывается с NMDA-рецептором постсинаптической зоны и рецептор открывает мембранные каналы, “разрешая” ионам кальция войти в клетку, эти ионы превращают CaMKII в активную форму, которая запускает каскад биохимических событий, повышающих чувствительность соответствующих, воспринимающих импульсы нейронов к поступающим к ним пресинаптическим сигналам.

Ген, кодирующий NMDA рецептор, был клонирован и детально изучен в группах Ричардса Тсиена (Richard Tsien) из Стэнфордского университета и Чарлза Стивенса (Charles Stevens) из Солковского (Salk) института. В обеих группах с помощью специальной техники тщательно проанализировали на количественном уровне физический сигнал, передаваемый через синаптический контакт от одного нейрона к другому с помощью нейротрансмиттера.

Как уже упоминалось, связывание нейротрансмиттера с постсинаптической областью клетки-мишени открывает каналы в клеточной мембране и тем самым вызывает поток ионов внутрь клетки. Если мембрану пересечет достаточное количество ионов, то возникнет электрический сигнал, распространяющийся по постсинаптической клетке. Средняя величина ионного потока через синапс детерминирует силу синапса – усилие, с которым может быть вызван нервный импульс. Увеличением силы специфических синапсов может быть объяснен процесс хранения памяти.

Возникает вполне естественный вопрос, каким образом достигается требуемое повышение синаптической силы. Существует две возможности: 1) пресинаптическая клетка начинает продуцировать больше

нейротрансмиттера; 2) постсинаптическая клетка становится более чувствительной, пропуская больше ионов в ответ на то же самое количество нейротрансмиттера.

Чтобы узнать, какая из этих двух гипотез правильная, Цзиен и Стивенс использовали новый, квантовый метод определения количества пакетов медиатора, высвобождаемого возбужденной клеткой. При этом предполагалось, что физиологической основой запоминания является долговременная потенция (*long-term potentiation*), сокращенно LTP. Было, в частности найдена распространенность этого феномена в гиппокампе, который включен в некоторые виды обучения и памяти. Оказалось также, что для осуществления LTP требуется рецептор для глутамата, т.е. NMDA рецептор используемого в гиппокампе нейромедиатора. Кроме того, было установлено, что LTP формируется на постсинаптической стороне межклеточного контакта. Характерно при этом, что NMDA рецептор открывает ионные каналы только в том случае, если постсинаптическая клетка уже электрически активирована, т.е. в то же самое время получила сигнал от другого нервного волокна. В случае присутствия таких конвергирующих сигналов NMDA рецепторы разрешают кальциевым ионам проникать в клетку-мишень. Такой поток вызывает биохимические изменения, обуславливающие появление LTP. Такой механизм, при котором синапс “усиливается” благодаря двумя конвергирующим сигналам, хорошо объясняет ассоциативные формы обучения. Показано также, что когда количество высвобождаемого пресинаптической клеткой глутамата увеличивается, в постсинаптической клетке наблюдается соответствующий ответ как NMDA, так и non-NMDA рецепторов. Однако в случае LTP увеличение демонстрируют только non-NMDA рецепторы. Эти различия указывают на то, что LTP не связан с увеличением высвобождения пресинаптического медиатора и его возникновение обязательно чувствительности рецепторов клетка-реципиента, т.е. осуществляется на постсинаптическом уровне. Однако Цзиен и Стивенс получили данные, свидетельствующие в пользу пресинаптического происхождения LTP (рис. 9.15).

Вполне возможно, что в этом процессе участвуют оба механизма. **Несомненно, впрочем, что мутации, затрагивающие образование NMDA рецепторов, отразятся на процессах обучения и памяти.**

Методы современной молекулярной генетики позволяют проверить это положение. Для этой цели используют так называемых “нокаутированных” животных (обычно мышей – *knockout-mice*), экспериментальным путем лишенных определенного гена, функции которого намереваются изучать.

Чтобы получить нокаутующую мутацию (*knock-out mutation*), последовательность клонированного гена должна быть изменена *in vitro* и затем введена в культуру эмбриональных стволовых клеток (ES). С низкой частотой мутировавший трансген замещает его нормальный аллель в хромосоме путем гомологичной рекомбинации – процесс, названный *targeting*. ES клетки, которые содержат нокаутированную мутацию, могут быть использованы, чтобы создать химеры, которые пригодны для получения трансгенных линий, несущих нокаутированную мутацию.

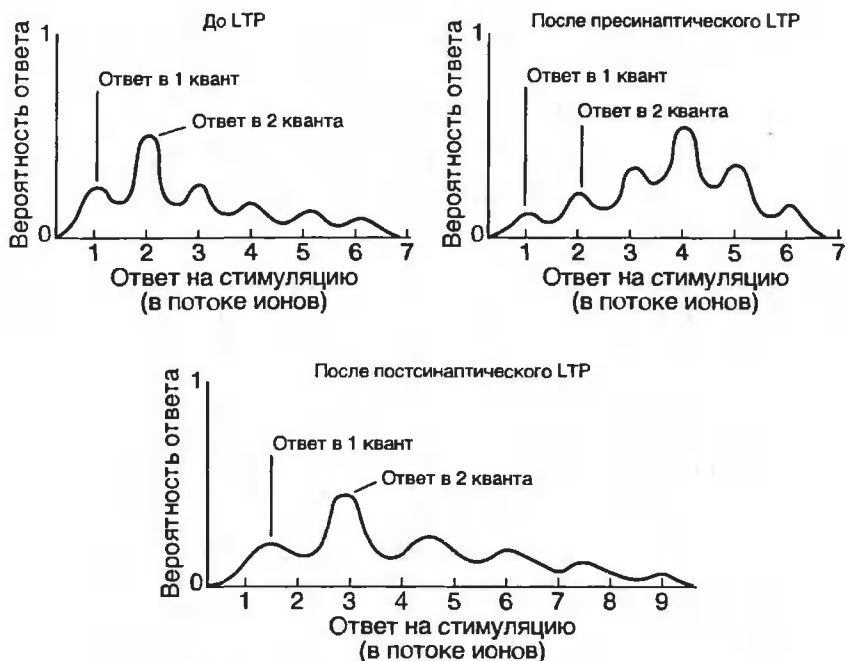


Рис. 9.15. “Квантовый анализ” LTP.

Представлены три кривые, иллюстрирующие этот метод. По оси ординат представлено количество квантов (пакетов нейротрансмитера), высвобождающихся из пресинаптического нейрона. По оси абсцисс показан ответ на это количество квантов в потоке ионов в постсинаптической клетке. Верхняя левая кривая представляет контрольную ситуацию до LTP обусловливания. Правая верхняя и нижняя кривые показывают две возможности после LTP. Если LTP возникал благодаря высвобождению большего количества квантов из пресинаптической клетки, то самая высокая точка кривой должна быть сдвинута вправо, но максимальный ответ мог бы быть выше, чем до того (средняя кривая). Если, с другой стороны, LTP возникал вследствие увеличенной чувствительности в постсинаптической клетке, максимальный ответ мог быть увеличен (от 6 к 9), но самая высокая точка кривой могла оставаться в том же самом отношении по отношению к кривой. По Tsien, Stevens, 1997.

Это осуществляется путем скрещивания двух гетерозиготных линий, чтобы вывести в гомозиготу нокаутированную мутацию и определить ее влияние на развитие и поведение (принцип метода см. в кн.: Л.И. Корочкин “Введение в генетику развития”. М.: Наука, 1999).

Была поставлена задача, основываясь на принципе, удалить ген, кодирующий рецептор для глутамата, только из небольшой группы клеток в гиппокампе, а не из каждой клетки мыши. Чтобы это сделать, в лаборатории Тонегавы был поставлен под контроль промотора гена СаМкиназы и интегрирован в геном ген Cre, который кодирует ДНК-сплайсирующий фермент. Затем была получена коллекция линий мышей, в которых ген Cre экспрессировался в различных комбинациях тканей, подражая паттерну экспрессии гена САМкиназыII. При этом в трех линиях мышей ген Cre экспрессировался только в определенном

типе клеток (пирамидных нейронах) и в определенных зонах гиппокампа. Для селективного удаления NMDA-рецептора таких мышей скрещивали с животными, которым с помощью генно-инженерных манипуляций ввели парные последовательности ДНК (twin sequences), расположенные перед и после гена, кодирующего NMDA-рецептор. У некоторых потомков от такого скрещивания фермент Cre узнавал такие двойные последовательности и “склеивал” их вместе, так что ген NMDA избирательно вырезался только в пирамидных клетках гиппокампа, где активно функционировал ген Cre под чужеродным промотором.

У таких мышей обнаруживали выраженные дефекты в способностях к обучению, сопровождаемые нарушениями LTP.

Сходные эксперименты проводились и с геном, кодирующим альфа САМ киназу. В этом случае при введении электродов в срезы мозга для стимуляции нервных клеток обнаружили нарушения LTP. Мышей тестировали также на способности к запоминанию. Их бросали в сосуд с водой, в определенном месте которого помещали небольшую платформу, взобравшись на которую подопытное животное могло “спастись”. В норме оно запоминало после нескольких проб место расположения платформы и в последующих опытах быстро ее находило. Известно, что такая форма пространственной памяти связана с функционированием гиппокампа. Оказалось, что у мышей с удаленным геном альфа САМкиназы наблюдаются значительные трудности с запоминанием местоположения платформы, и они были неспособны сохранить в своей памяти соответствующий пространственный образ. Мозг таких мышей на первый взгляд кажется совершенно нормальным, однако Кандель отметил, что при более детальном анализе у них можно обнаружить некоторые дефекты нейрогенеза, приводящие к увеличению числа нейронов в некоторых зонах гиппокампа по сравнению с нормой.

Кандель с сотрудниками проводили также опыты и с другими киназами. Мыши, нокаутированные по разным киназам, демонстрировали разную реакцию LTP на эти дефекты. Животные, “утратившие” киназы Yes и Src, имели нормальный LTP, но в случае отсутствия киназы Fyn отмечались дефекты LTP. Интересно, что поведенческие особенности нокаутированных по Fyn мышей зависели от того, в какой генотипической среде выполнялся “нокаут”. В одной среде подопытные мыши характеризовались редуцированным LTP и неспособностью к запоминанию местоположения платформы в плавательном “бассейне”, в другой – обучались более или менее нормально. Отсюда следует, что в процесс регуляции LTP и обучения вовлечены и другие гены. Тем не менее, можно смело сказать, что получены доказательства связи киназ с LTP и LTP со способностью к обучению и долговременной памятью.

Можно также сказать, что ни Fyn, ни САМ киназы не обеспечивают полностью нормальную реализацию LTP, поскольку у нокаутированных по обеим киназам мышей LTP, хотя и значительно редуцирован, но не элиминирован полностью. Очевидно, в процессе эволюции сложился достаточно сложный полигенный механизм, регулирующий LTP и связанные с ним процессы обучения и памяти.



Григорий Николаевич Ениколопов. Российский молекулярный биолог, успешно работающий в Колд-Спринг-Харборе (США). Вместе с Борисом Кузиным исследовал роль NO-синтазы в развитии дрозофилы.

Недавно Г.Н. Ениколопов вместе с Б.А. Кузиным обнаружили, что у дрозофилы (и, вероятно, точно так же у других организмов) уровень развития того или иного органа, его размеры и т.д. формируются в онтогенезе при участии фермента NO-синтазы, ответственного за образование недавно открытого нового нейромедиатора — NO. Очевидно, становление системы запоминания зависит от актив

тивности этого фермента, поскольку его гиперактивность ведет к торможению клеточной пролиферации, а снижение активности, напротив, к гиперпродукции клеточных элементов, составляющих данную систему. Как уже отмечалось, эффективность функционирования мозга связана с количеством составляющих его клеток. Как показали упомянутые выше авторы, детерминация этого количества обусловлена молекулярно-генетическими механизмами, среди которых определенную роль могут играть ферменты, задействованные в синтезе нейромедиаторов.

ЛИТЕРАТУРА

- Ашмарин И.П.* Загадки и откровения биохимии памяти. Л.: Изд-во ЛГУ, 1975.
Гэйто Дж. Молекулярная психология. М.: Мир, 1969.
Корочкин Л.И., Шумская И.А. Биохимико-генетические аспекты памяти // Механические модуляции памяти. Л.: Наука, 1976. С. 192–198.
Нейрохимия. М.: Ин-т биомедхимии, 1996.
Оленев С.Н., Корочкин Л.И., Демин Д.В. Некоторые морфологические и химические предпосылки вербальной памяти // Успехи соврем. биологии. 1968. Т. 65. С. 245–266.
Роуз С. Устройство памяти: От молекулы к сознанию. М.: Мир, 1995.
Хорн Г. Память, импринтинг и мозг. М.: Мир, 1985.
Шелер Р., Аксель Р. Как гены контролируют врожденное поведение // В мире науки. 1984. № 5. С. 28–37.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, в той области науки, которая носит название **нейрогенетика**, накоплен фактический материал, демонстрирующий, что особенности поведения животных и человека в значительной степени детерминированы **генетически**. Естественно, что гены, от которых зависят эти особенности, характеризуются определенной колеблемостью проявления их эффекта в рамках той или иной **нормы реакции**. Эта колеблемость (вариабельность) зависит от многих факторов, в первую очередь от генов-модификаторов, на ней также сказываются влияния внутренней (межклеточные морфогенетические взаимодействия, гормональный баланс и т.д.) и внешней среды, отражающиеся на разных уровнях (от транскрипционного до посттрансляционного) на характере экспрессии различных структурных генов, включая нейроспецифические.

Основной постулат, который мы старались обосновать в нашей книге заключается в том, что **гены, “определяющие” поведенческие реакции, реализуют свое влияние в процессе индивидуального развития, “конструируя” специфическую организацию мозга, “выстраивая” (при участии морфогенетических реакций) ряды нейронных ансамблей (модулей), межнейронных отношений и синаптических контактов таким образом, что сложившаяся в онтогенезе морфофункциональная система как бы “преформирована” к осуществлению поведенческих актов именно таким, а не иным способом. И этот способ, этот вид поведения варьирует только в рамках соответствующей нормы реакции, детерминированной генетически, и присущ именно данной особи в силу специфичности, “индивидуализированности” геноконтролируемого развития нервной системы.**

Иными словами, гены детерминируют не поведение, а специфическую организацию мозга, которая, будучи генетически “преформированной”, в свою очередь и определяет специфику поведенческих реакций.

Таким образом, в нейрогенетике в своеобразной форме действует тот же принцип, что и в генетике развития вообще – принцип **преформизма**. Точно так же, как и в эмбриогенезе вообще, система генов, регулирующая развитие мозга, организована по иерархическому принципу, так что в каждом регуляторном генетическом каскаде участвует множество соподчиненных генов, взаимодействующих на разных уровнях (см. Л.И. Корочкин “Введение в генетику развития”).

В генетике развития известен принцип колинеарности в расположении генов и кодируемых ими признаков. В нейрогенетике имеет место сходный принцип колинеарности в пространственной организации ин-

нервируемого субстрата и иннервирующего центра (фигура “маленького человечка” в премоторной и моторной извилинах головного мозга). Как в эмбриологии вообще, так и в нейроэмбриологии можно выделить **три автономно функционирующих генетических системы**, контролирующих три соответственно автономных процесса : формообразовательные события, дифференцировку специфических морфологических типов клеток, химическую спецификацию этих клеток. Известны случаи, когда процесс нейруляции проходит нормально и нервная трубка замыкается, однако дифференцировка входящих в ее состав нейробластов не происходит. Напротив, в случаях нарушения замыкания нервной пластинки в нервную трубку наблюдалась дифференцировка нейробластов этой пластинки в нервные клетки, морфологически вполне развитые. Точно так же возможен синтез нейроспецифических белков в клетках, независимо от характера общего развития. В частности, в ходе экзогаструляции, когда происходит не выпячивание, а, напротив, выпячивание хордomezодермы, эктодерма как бы отделяется от остальной части зародыша, и морфогенетические процессы в ней не наблюдаются, так что ни нервная пластинка, ни нервная трубка не формируются, не дифференцируются и нейробласты, однако нейроспецифические белки в клетках такой эктодермы синтезируются.

Подобно тому как совершающиеся в эмбриогенезе события разыгрываются на основе взаимодействия процессов активации и торможения, дифференцировка и функционирование нервной системы так же основывается на такого рода взаимодействиях.

Наконец, развитию нервной системы так же, как и эмбриогенезу в целом, свойственна автономия частей при единстве целого. Это качество проявляется, начиная с нейральной индукции, и находит свое завершение в системном характере нейрогенеза (системогенез).

Таким образом, как развитие, так и функционирование тканевых систем, в частности, нервной системы, основываются на неких общих принципах, сформулированных в последние годы и проливающих свет на закономерности генетической регуляции молекулярных и морфогенетических процессов.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
-------------------	---

Часть I

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НЕЙРОГЕНЕТИКИ

Введение	5
Глава 1	
Нейронная теория – основа нейрогенетики	7
Глава 2	
Формирование межнейронных связей и поведение	32
Организация нервной системы и поведение. Филогенетический аспект ...	32
Организация нервной системы и поведение. Онтогенетический аспект ...	52

Часть II

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ЕГО ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

Глава 3	
Нейральная индукция: феноменология и молекулярные механизмы	63
Нейральная индукция. Эмбриологическая феноменология	65
Нейральная индукция: молекулы-активаторы	69
Выход из застойного периода	69
Нейральные индукторы-активаторы	73
Нейральная индукция: молекулы-ингибиторы	78
Эффекты дезагрегации-реагрегации эктодермальных эксплантатов	78
Антагонисты и ингибиторы нейрализации эктодермы	79
Нейральная индукция: модели и механизмы	81
Нейральная индукция: сравнительные аспекты	83
Глава 4	
Первичная регионализация нервной системы: модели молекулярные факторы и морфогенетические градиенты	88
Регионализация нейроэктодермы: гипотезы и модели	90
Что такое морфоген?	93
Регионализация нейроэктодермы: двухградиентная морфогенетическая модель	94

Регионализация нейроэктодермы: факторы. трансформирующие ней- ральные потенции	98
---	----

Глава 5

Генетические основы нейрогенеза.....	104
---	------------

Часть III

ГЕНЫ И ПОВЕДЕНИЕ

Глава 6

Генетический контроль поведенческих реакций	147
--	------------

Глава 7

Некоторые экспериментальные модели для анализа генетических и молекулярных аспектов поведения	171
--	------------

Поведение бактерий и простейших: молекулярный мотор	171
---	-----

Генетика поведения нематод	173
----------------------------------	-----

Половое поведение дрозофилы	180
-----------------------------------	-----

Молекулярно-генетические аспекты полового поведения моллюсков	185
---	-----

Генетическая регуляция биоритмов	191
--	-----

Химерный мозг и поведение	191
---------------------------------	-----

Что такое химеризм?	191
---------------------------	-----

Влияние различных трансплантаций на поведение	191
---	-----

Гинандроморфизм (половой мозаицизм) и поведение	196
---	-----

Трансплантация ткани мозга и поведение насекомых	197
--	-----

Использование метода трансплантации для изучения некоторых форм па- тологического поведения.	202
--	-----

Доместикация и рассудочная деятельность	202
---	-----

Глава 8

Гены и патология поведения	215
---	------------

Гены и патология поведения дрозофилы	215
--	-----

Генетически детерминированная аудиогенная эпилепсия	216
---	-----

Гены и болезнь Альцгеймера	224
----------------------------------	-----

Гены и нарушения поведения при некоторых других заболеваниях	231
--	-----

Глава 9

Молекулярно-генетические события, сопровождающие процессы обучения и памяти	239
--	------------

Попытки найти молекулы памяти	239
-------------------------------------	-----

Генетические способности к обучению у дрозофилы	242
---	-----

Анализ процессов обучения и памяти у птиц	256
---	-----

Анализ процессов обучения и памяти у млекопитающих	262
--	-----

Заключение	271
-------------------------	------------

Научное издание

Корочкин Леонид Иванович
Михайлов Александр Трофимович

ВВЕДЕНИЕ В НЕЙРОГЕНЕТИКУ

Утверждено к печати
Ученым советом Института биологии гена
Российской академии наук

Зав. редакцией *А.М. Гидалевич*
Редактор *Г.М. Орлова*
Художник *Л.Л. Михалевский*
Художественный редактор *В.Ю. Яковлев*
Технический редактор *В.В. Лебедева*
Корректоры
А.В. Морозова, В.М. Ракитина, Н.И. Харламова

Набор и верстка выполнены в издательстве
на компьютерной технике

ЛР № 020297 от 23.06.1997

Подписано к печати 12.07.2000

Формат 60 × 90¹/₁₆, Гарнитура Таймс

Печать офсетная

Усл. печ. л. 17,5. Усл. кр.-отт. 17,9. Уч.-изд. л. 22,2

Тираж 850 экз. Тип. зак. 3437

Издательство "Наука"

117864 ГСП-7, Москва В-485, Профсоюзная ул., 90

Санкт-Петербургская типография "Наука"

199034, Санкт-Петербург В-34, 9-я линия, 12

В ИЗДАТЕЛЬСТВЕ «НАУКА»
ВЫШЛА В СВЕТ КНИГА:

Патрушев Л.И.
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

46 л.

В монографии рассмотрены современные представления о строении и механизмах функционирования генов прокариот и эукариот, а также основные методы их исследования. Книга состоит из двух частей. В первой части обсуждаются структура генома прокариотических и эукариотических организмов, а также механизмы транскрипции, трансляции, репликации, репарации и их регуляции. Сформулирована современная концепция гена. Во второй части монографии рассмотрены принципы основных методов, используемых в исследованиях генов. Главное внимание уделено современным методам геномной инженерии. Обсуждаются наиболее важные аспекты развития современной молекулярной генетики в исследованиях направленного мутагенеза и белковой инженерии, антисмысловых РНК, аптамеров, рибозимов и дезоксирибозимов, трансгеноза и генотерапии, а также достижения в разработке микрочипов ДНК, ДНК-диагностике и ДНК-типировании и изучении генома человека. В книге учтены данные литературы на конец 1999 г.

Для научных работников, аспирантов и студентов, специализирующихся в области химии и биологии.

В ИЗДАТЕЛЬСТВЕ «НАУКА»
ГОТОВЯТСЯ К ПЕЧАТИ
СЛЕДУЮЩИЕ КНИГИ:

Дубинин Н.П.

Избранные труды

Том 2

РАДИАЦИОННЫЙ И ХИМИЧЕСКИЙ МУТАГЕНЕЗ

38 л.

Второй том избранных трудов выдающегося ученого-генетика академика Н.П. Дубинина посвящен проблемам радиационного и химического мутагенеза. В нем содержатся наиболее важные работы Н.П. Дубинина по общим вопросам радиационной генетики, по влиянию ионизирующих излучений на наследственность человека, а также фундаментальные статьи по медицинской генетике. Приведены новаторские исследования Н.П. Дубинина по химическому мутагенезу, на основе которых им было сформулировано представление об этапности становления мутаций и концепция преимущественных потенциальных изменений хромосом как основа формирования генных и хромосомных мутаций.

Для всех интересующихся работами по генетике, для селекционеров, радиобиологов и историков науки.

ПРОБЛЕМА БЕЛКА

Т. 4

Попов Е.М.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ БЕЛКА

35 л.

В книге рассмотрено концептуальное развитие исследований структурно-функциональной организации белка. Выявлен генезис представлений о связи между структурой и функцией. Проанализированы гипотезы биокатализа. Обсуждены результаты априорных расчетов взаимодействия ряда ферментов с субстратами и ингибиторами. Сформулирована общая теория структурно-функциональной организации белков. Рассмотрен количественный подход к изучению механизмов белковых взаимодействий. Обсуждены методы исследования ферментативных реакций.

Т. 1 вышел в свет в 1995 г., т. 2 – в 1996 г., т. 3 – в 1997 г.
Для биохимиков, химиков, биофизиков.

**АДРЕСА КНИГОТОРГОВЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ
ТОРГОВОЙ ФИРМЫ “АКАДЕМКНИГА”**

Магазины “Книга—почтой”

121009 Москва, Шубинский пер., 6
197345 Санкт-Петербург, ул. Петрозаводская, 7

Магазины “Академкнига” с указанием отдела “Книга—почтой”

690088 Владивосток, Океанский проспект, 140 (“Книга—почтой”)
620151 Екатеринбург, ул. Мамина-Сибиряка, 137 (“Книга—почтой”)
664033 Иркутск, ул. Лермонтова, 289 (“Книга—почтой”)
660049 Красноярск, ул. Сурикова, 45 (“Книга—почтой”)
117312 Москва, ул. Вавилова, 55/7
117192 Москва, Мичуринский проспект, 12
103642 Москва, Б. Черкасский пер., 4
630091 Новосибирск, Красный проспект, 51 (“Книга—почтой”)
630090 Новосибирск, Морской проспект, 22 (“Книга—почтой”)
142292 Пущино, Московской обл., МР “В”, 1 (“Книга—почтой”)
443002 Самара, проспект Ленина, 2 (“Книга—почтой”)
199034 Санкт-Петербург, В.О., 9-я линия, 16
191104 Санкт-Петербург, Литейный проспект, 57
199164 Санкт-Петербург, Таможенный пер., 2
194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4
634050 Томск, Набережная реки Ушайки, 18 (“Книга—почтой”)
450059 Уфа, ул. Р. Зорге, 10 (“Книга—почтой”)
450025 Уфа, ул. Коммунистическая, 49

*По вопросам приобретения книг
просим обращаться также
в издательство по адресу:
117864, Москва, ул. Профсоюзная, 90
тел. (095) 334-98-59*

Л. И. Корочкин

А. Т. Михайлов

Введение в НЕЙРОГЕНЕТИКУ

