

ПРОГРАМА

ЗА КОМПЛЕКСНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЧОВЕКА И НЕГОВИЯ МОЗЪК

НАУЧНО –
ИНФОРМАЦИОННИ
ОБВОРИ

МЕЖДУВЕДОМСТВЕН
ПРОГРАМЕН СЪВЕТ

УПРАВЛЕНИЕ НА ПРОГРАМАТА

1

СОФИЯ

1986

**ПРОГРАМА ЗА КОМПЛЕКСНО ИЗСЛЕДВАНЕ
НА ЧОВЕКА И НЕГОВИЯ МОЗЪК**

НАУЧНОИНФОРМАЦИОННИ ОБЗОРИ

свитък 1

СОФИЯ, 1986

РЕДАКЦИОННА КОЛЕГИЯ

Главен редактор проф. Хр. Христозов

Зам. гл. редактор проф. Ал. Вълчев

Членове: чл.-кор. проф. А. Върбанова, проф. Ив. Калайков, проф. Д. Хаджиев, доц. Ас. Жабленски, д-р Т. Томов

Секретар д-р Р. Рачева

Предговор

Дългосрочната целева програма за комплексно изследване на човека и по-специално на неговия мозък с оглед повишаване на интелектуалните възможности на личността и разгръщането на нейните творчески сили беше утвърдена с Решение № 876 на Политбюро на ЦК на БКП от 17.10.84 г. В своята реализация по механизма на програмно-целевия подход тя е призвана да задоволи необходимостта на нашето общество в епохата на научно-техническата революция от все по-висока интелектуализация на основните видове труд и изграждане на многостранно развита социалистическа личност. Една от формите на информационно обогатяване и обмяна ще бъде поредицата „Научно-информационни обзори“, с чийто първи свитък започва периодичното им издаване. Целта на това издание е да подпомага усилията на научните работници, участващи в Програмата, а и на други научни работници да поддържат жива връзка с важни страни на съвременната наука и с колективите от научни работници, изпълняващи задачите по Програмата.

София, 02.12.1986 г.

Проф. д-р Христо Христозов,
председател на програмния съвет

**КОНЦЕПЦИИ, ТЕОРИИ, РАБОТНИ ХИПОТЕЗИ ЗА ПАМЕТА
И ОБУЧЕНИЕТО, ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНИ, СВЪРЗАНИ С ТЯХНОТО
ПРИЛАГАНЕ ОТ РАЗЛИЧНИТЕ РАБОТНИ КОЛЕКТИВИ
НА ПРОГРАМАТА (при лабораторни животни)**

Димитър Йонков — Институт по физиология при БАН,
Секция по експериментална фармакология (Тема 1А)

I. ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНИ

Едно от най-ранните научни определения за паметта е на У. Джеймс през 1897 г. (по Бородкин и Крауз, 1978). Той я характеризира като идеална представа за миналия опит в нервната система на човека и животните, свързана с дадена ситуация. Днес паметта се счита за една от най-сложните и диференцирани функции на висшата нервна дейност, съществен елемент на адаптационните възможности на организмите и тясно свързана с тяхното поведение: (Ильющенок, 1972; Matth., 1974; Ott, 1977; Громова, 1980; Георгиев и Овчаров, 1985, и др.). Според посочените автори под обучение се разбира възприемането на информацията чрез сетивните рецептори и отправянето ѝ към подкоровите и коровите отдели на теленцефалона. Арушанян и Белозерцев (1978) смятат, че на този етап в паметовото формиране психостимулаторите облекчават асоциативните отговори и тяхната генерализация и поради това при изработването на условна реакция са необходими по-малко тренировки за постигане на критерий за обученост. Понятието „памет“ днес се свързва с невробиологичните процеси на регистрация, отбор, съхранение и възпроизвеждане на информацията в структурите на главния мозък (Ильющенок, 1972; Бородкин и Крауз, 1978). Застъпва се становището, че обучението и паметта са резултат от цялостната дейност и пластичност на ЦНС (Брехман, 1976; Ott, 1977). Оптималното протичане на паметовите процеси обезпечава изграждането на паметовите следи (енграмите), т. е. на комплекса от специфични функционални, биохимични и структурни промени, които съставляват перцептивната следа в ЦНС (Бородкин и Крауз, 1978). С основание Симонов (1979) счита, че следовата дейност на мозъка е материалният субстрат на паметта.

Бехтерева (1976) посочва, че днес все по-широко се приема съществуването на „филогенетична“ и „онтогенетична“ памет. Счита се, че „вроденият“ опит се съхранява и предава на поколенията с ДНК в клетъчното ядро (Hyden, 1972; Крылов, 1979). „Придобитият“ опит се представя като система от условнорефлексни връзки в ЦНС и има

индивидуален характер (Matthies и сътр., 1976). Допуска се, че „онтогенетичната“ памет се кодира на функционалните невронни мрежи в различни подкорови и корови структури на главния мозък (Freud, 1895; Sherrington, 1947; Hebb, 1949) или като промени в синтеза на белтъка и нуклеиновите киселини в невронните мембрани (по Громова, 1980). Крылов (1979) разглежда в критична светлина тези хипотези и посочва, че все още липсват убедителни доказателства за тяхното утвърждаване. Както ще бъде посочено по-долу, Mc Gaugh, Matthies и други автори разглеждат тези процеси като етапи във формирането и съхранението на паметовите следи.

Съществуват различни класификации на паметта. При животни и хора Громова (1980) различава: произволна и непроизволна; модально-специфична и неспецифична; непосредствена и опосредствувана; зрителна, слухова, моторна, образна, условнорефлексна, емоционална и словеснологична (последната е специфична само за човека); краткосрочна и дългосрочна памет.

Обучението и паметта не могат да бъдат директно изследвани. Поради това те са били загадка за древните и средновековните мислители, около която са възниквали причудливи и често свръхестествени представи. Предложеният от И. П. Павлов и неговите ученици метод на условните рефлексии при изучаване на висшата нервна дейност предоставя на изследователите съществен индикатор за изучаване на паметта. Наред с това за по-задълбоченото разбиране на механизмите на паметовите процеси широко се използват неврофизиологични, неврохимични, поведенчески и фармакологични методи, които осигуряват големи възможности за анализирането им.

Buresova и Bures (1976) подразделят условнорефлексните поведенчески задачи за изследване процесите на обучение и памет при животните на: 1) класически (Павловски) условни реакции, 2) задачи с активно и пасивно условно избягване, 3) задачи за изследване на оперативното (инструментално) поведение и 4) различителни (светлина, звук, цвят, различни фигури) задачи. Използват се също т. нар. „отсрочени реакции“ при изучаване на краткосрочната памет, методи за преобучаване или за угасяване на вече изработена условнорефлексна реакция при изучаване на дългосрочното съхранение на паметовите следи (Селиванова и Голиков, 1975; Бородкин и Крауз, 1978). Освен това се различават задачи с наказателно и с положително подкрепление. В първия случай като безусловно подкрепление се прилага дразнене с електрически ток по лапките или муцунката на опитното животно или подаване на течност с неприятен за животното вкус или мирис. Във втория случай условнорефлексното възнаграждение може да бъде храна, вода, захарен разтвор или хипокампадно стимулиране с електрически ток с „възнаграждаващ“ характер (по Buresova и Bures, 1976; по Кругликов, 1981). Повечето изследователи изтъкват, че подборът на методиките

трябва да съответствува на задачите, които експериментаторът си поставя за решаване (по Thompson и сътр., 1972; Matthies и сътр., 1973, и др.).

За памет се говори и при низшите животни — насекоми, червеи и дори едноклетъчни. Като субстрат на тази тяхна способност се посочват нервните ганглийни образувания или нервният апарат на клетката (при едноклетъчните). Тази памет обаче е на много ниско равнище и съчетава отразителната способност на тези същества със съхраняването на елементарна информация за определен период от време (по Йонков, 1985). Нервни елементи при някои низши животни (насекоми, мекотели) се използват в експерименталната практика за моделиране на някои страни от паметовото изграждане.

II. ХИПОТЕЗИ И ТЕОРИИ ЗА ПАМЕТОВОТО ИЗГРАЖДАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ

1. Етапи в изграждането и съхранението на паметовите следи

В протичането на паметовите процеси се различават няколко етапа и съответно няколко вида индивидуална памет. Съществуват различни класификации в това отношение, предлагани от различните изследователи на паметта. Най-широко признание напоследък получи подразделянето на процесите на паметообразуването на: възприемане (и непосредствена памет), краткосрочна памет, консолидация (и интермедиерна памет) и дългосрочна памет (Mc Gaugh, 1973; Гречин, 1976; Matthies, 1974; Коган, 1970; Бородкин и Крауз, 1978, и др.).

Непосредствената памет се отъждествява с взаимодействието на външното въздействие със субстрата на сензорния рецептор и възприемането на информацията (Matthies, 1974; Matthies, 1974; Ott, 1977). Възприятието предизвиква начална активност на рецептора, която преминава в системна активност на невроните и задвижва техните биохимични процеси. Счита се, че този етап продължава 6–12 сек.

Краткосрочната памет се определя като ограничено по време съхранение на незначителен обем информация и се обуславя от непродължителната циркулация на възбудния импулс в затворени мозъчни невронни вериги (т. нар. „реверберация на импулсите“) (Коган, 1970; Matthies, 1974; Бородкин и Крауз, 1978). Някои автори (Geller, Jarvik, 1968; McGaugh, Landfield, 1970; Huges и сътр., 1970) обръщат внимание, че ретроградна амнезия настъпва не веднага след въздействие с амнезиращ фактор (напр. електрошок), а известно време по-късно. Това дава основание да се мисли, че основа за съхранението на информацията не са невродинамични процеси (реверберация), а механизми с метаболитна

природа, осигуряващи възможността за реверберация на импулсите. Към тези механизми се отнасят: конформационни преустройства на мембранните белтъци (Matthies, 1979), усиление синтеза на цикличните нуклеотиди и ускоряване фосфорилирането на мембранните белтъци в синапса, което довежда до промяна в ефективността на синапсната структура (Greengard, 1976; Daly, 1977; Кометиани и съавт., 1980). Според Кругликов (1981) процесите на краткосрочна памет могат да бъдат свързани с фосфорилирането на белтъците на синапсните мембрани. Счита се, че краткосрочната памет продължава до 30 мин след обучението и се повлиява със средства, въздействащи върху синапсното предаване: оптимизиране активността на трансмитерните системи, централни стимулатори, стимулация на средномозъчната ретикуларна формация, анестетици, предизвикващи гърчове средства, електроконвулсивен шок и пр. (Ott и Matthies, 1973; McGaugh, 1973, и др.). Gibbs и Ng (1977) различават собствена фаза на краткосрочна памет — продължаваща до 10 мин след обучението, и лабилна (интермедиерна) памет — до 30 мин след обучението. Интермедиерната памет е податлива на амнезиращи влияния, но не се повлиява със средства, инхибиращи белтъчния синтез.

Дългосрочната памет се схваща като продължително съхраняване на неограничен обем информация, преминала обработка в структурите на ЦНС и обусловен от устойчиви морфологични и биохимични промени в нервната система (Бородкин и Крауз, 1978). Допуска се, че възприетата информация предизвиква съществени промени в работата на генома, който стимулира синтеза на нови протеини (Кругликов, 1978). Новосинтезираните в невроните белтък действуват като пусков механизъм в преустройството и провеждането в синапсите и облекчава изграждането на нови връзки с траен характер между невронните популации в ЦНС, считани за материална основа на дългосрочното паметово съхранение (Коган, 1970; Илюченков, 1972; Крылов, 1979). На този етап паметта се повлиява със средства, които имат ефект върху възпроизвеждането и изпълнението на усвоената задача (Matthies, 1974). Устойчивостта на дългосрочната памет постепенно нараства, достига пик на стабилно възпроизвеждане между 7-ия и 10–12-ия ден след обучението и постепенно отслабва с времето (Dennis, 1974; Селиванова и Голиков, 1975; Ott, 1977).

Във формирането на дългосрочната памет участвуват редица процеси на укрепване и консолидация на информацията, които започват с въвеждането на информацията в ЦНС и приключват с формирането на трайна и устойчива паметова следа (Matthies, 1974; Ott, 1977; Громова, 1980; Кругликов, 1981, и др.). Едни автори допускат, че консолидационните процеси продължават до 24 ч след приключване на възприятието (Drischel, 1972; Селиванова и Голиков, 1975; Гречин, 1976; McGaugh, 1973, и др.). Други автори (по Ott, 1977) допускат, че консолидацията

продължава до 6 дни след обучението, след което вече е изградена „свърх-устойчива“ следа, неподатлива на лекарствено въздействие и реактивиране с подаване на тренировъчната задача.

Редица фактори могат да повлияят изграждането на дългосрочната паметова следа: физиологични състояния, генетични особености на индивидите, възрастта им, емоционалното състояние, характерът на тренировъчната задача и пр. (McGaugh, 1973; Громова, 1980; Кругликов, 1981). Различават се ранна фаза на консолидацията, която се повлиява със средства, въздействащи върху активността на мозъчните медиаторни системи, с йонни въздействия, с психостимулатори и пр. (McGaugh, 1972; Ott и Matthies, 1973; Ильюченко, 1973; Гречин, 1976, и др.), и късна фаза на консолидацията, която се повлиява със средства, блокиращи синтеза на РНК и мозъчните протеини, понижаване температурата на мозъка и пр. (Matthies, 1974; Кругликов, 1978, и др.). Трябва да подчертаем, че консолидационната теория не е всеобщоприета. Някои автори, включително и големият съветски изследовател на мнестичните процеси Ильюченко, през последните години отхвърлят съществуването на консолидация на нововъзприетата информация. Il'yutchenok (1982) счита, че след възприятието следата се фиксира почти моментално в ЦНС, а нейното различно извяване при възпроизвеждането ѝ зависи от развитието на участието на емоциогенните системи на мозъка.

Възпроизвеждането на информацията (ретрийвъла) се смята също за многостепенен процес с участие на различни невромедиаторни системи и мозъчни структури (Ильюченко, 1976). Допуска се, че апаратът за възпроизвеждане се формира едновременно с паметовите следи по време на консолидацията (Кругликов, 1979). Възпроизвеждането може да бъде повлияно с фармакологични средства, въздействащи предимно върху изпълнението на задачата (Doty и Doty, 1966; Bauer, 1972; Кругликов, 1978).

Съществуват два възгледа за съотношението между краткосрочната и дългосрочната памет: 1) два паралелни стадия в развитието на запаметяването със собствени механизми (Matthies, 1974; Ott, 1977; Бородин и Крауз, 1978); 2) два последователни стадия на единен процес в паметовото изграждане и съхранение (Gold и McGaugh, 1975).

2. Участие на невронни и синапсни механизми и мозъчни структури във формирането и съхранението на паметовите следи

Много учени допускат, че в периода на възприемането на информацията се изграждат големи ансамбли от функционално свързани неврони (с холинергичен характер – Deutsch, 1971) с висока степен на кохерентност на възбудните разряди в тях (по Крылов, 1979). Смята се, че тук се извършва преработката на постъпилата в ЦНС информация.

нейното отсейване по принципа на значимостта ѝ за адаптационните нужди на организма, формирането и съхранението на паметовите следи и възможността за възпроизвеждането им. За осъществяването на тези функционални ансамбли от неврони в ЦНС голяма роля играят промените в синапсните контакти под влияние на възприетата информация. Нарасналата им „пропускателна“ способност облекчава реверберацията на новопостъпилата информация в периода на ранната консолидация, облекчава процесите на късната консолидация, свързани с изграждането на дълготрайни и устойчиви на външно влияние паметови следи, и създава „утъпкан път“ за тяхното възпроизвеждане, припомняне и модулиране на цялостното поведение на живия организъм в съответствие на жизнените му нужди (Essman, 1973; Манина, 1976, и др.). Редица автори (Закусов, 1973; Аничков, 1974; Азарашвили, 1976) смятат синапсите като основно място за повлияване на паметовите процеси с невротропни средства.

Импулсният код, възникнал вследствие на възприетата от сензорния рецептор информация, предизвиква невробиологични промени в невроните (конформационни промени на меморанните белтъци, йонни премествания и пр.), преминава през синапсните каскади до подкорковите и коровите отдели на теленцефалона и се превръща в динамичен процес на невронните популации (Ungar, 1973; Бородин и Смирнов, 1974; Ishikawa и Saito, 1978, и др.). Формирането на паметовите следи се свързва и с предизвиканата от новопостъпилата информация промяна в активността на мозъчните медиаторни системи (Deutsch, 1971; Kety, 1972; Essman, 1973, и др.). Реверберацията на импулсите в периода на ранната консолидация се счита за основен възбудител на по-нататъшните химични и синтетично-структурни преустройства в невронните ансамбли, свързани с дългосрочното съхранение на информацията, а именно повишава се рецепторната чувствителност, засилва се аксоплазматичният ток в невроните, изграждат се нови синапсни контакти и пр. (Бородин и Крауз, 1978).

Изграждането и съхранението на паметта днес се схваща като резултат от огромната пластичност на невроните в ЦНС. Много данни сочат неограничената възможност за участие на едни и същи неврони в различни невронни ансамбли и следователно в съхранението на различни видове паметови следи (Deutsch, 1971; Ungar, 1973; Кругликов, 1981). Паметта се схваща и като резултат от интегрираното участие и взаимодействие на голям брой подкоркови и корови структури на главния мозък и най-вече между тези на лимбичната система, ретикуларната формация и новата кора (Бериташвили, 1976; Taylor, 1972; Ливанов, 1973, и др.).

Счита се, че лимбичната система упражнява контрол над „входа“ на информацията. Допуска се, че структурите на големия лимбичен кръг (хипокамп, тегментум, септум, мамиларни тела, предни таламични ядра и лимбична кора) участвуват активно в процеса на паметовото из-

граждане и съхранение (Taber, 1971; Буданцев, 1976, и др.). Лимбичен кръг (хипоталамус, амигдални тела) участва в системата на емоциите, която регулира процесите на паметообразуването (Kornhuber, 1973; Прибрам, 1975, и др.). Ретикуларната възходяща активизираща система в средния мозък повлиява процесите на бодърстване и внимание и облекчава процесите на краткосрочната памет и ранната консолидация (McGaugh, 1974; Kasner a. Conner, 1972; Ильюченко, 1973).

Много автори посочват участието на хипокампа в процесите на внимание, разпознаване на новите сигнали и ориентацията, както и в съхранението на енграмите (Крушинская, 1970; Zornetzer и сътр., 1974; Wetzel и сътр., 1977, 1978; Pohle и сътр., 1979, и др.). Тета-активността на хипокампа по време на обучението се свързва с проявите на внимание и ориентация и се счита за корелат на мозъчно състояние, което облекчава формирането и съхранението на паметта (Irisawa и сътр., 1976; Jaffered и сътр., 1977; Ott, 1979).

Допуска се участие на септалните ядра, на лимбичната кора и други структури (Бородкин и Крауз, 1978). Според експериментални данни челните дялове на мозъчната кора обезпечават регистрацията и съхранението на смисловата информация и нейното възпроизвеждане, тилната кора — организирането на последователността на перцептивния образ, а слепоочните дялове на кората — запаметяването на информацията. Счита се, че участието на хипокампа и слепоочната кора е функционално спрегнато (Mandel и сътр., 1974; Прибрам, 1975, и др.). Голям интерес представляват електроенцефалографските данни и психофармакологичните проучвания за взаимоотношенията на мозъчните структури в процеса на обучение и паметово съхранение. Изследвания на Крауз (1976а, б) установяват, че подобряващи паметта средства повишават равнището на възбуда на средномозъчната ретикуларна формация, вентралния дял на хипокампа, базалните амигдални отдели и челната кора и снижават равнището на възбуда на дорзалния хипокамп, мамиларните тела, дорзалната част на амигдалите и на предните таламични тела. Влошаващи паметта средства най-общо не предизвикват определени промени в знака на възбуждение на взаимодействащите мозъчни структури. Допуска се обаче в този случай, че се нарушават взаимодействията между лимбичните, ретикуларните и коровите образувания в ЦНС. Обобщавайки тези данни, Бородкин и Крауз (1978) смятат, че подобряващите паметта въздействия повишават обменните процеси в главния мозък и стимулират изграждането на качествено нова организация в процесите на лимбико-ретикуларната система на мозъка и новата кора.

3. Молекулярни основи на паметта

Постиженията на молекулярната биология през втората половина на нашия век довеждат до възникването на редица хипотези относно

но механизмите на изграждане и съхранение на паметовите следи в мозъка. В опити с обучение на плъхове Hyden и Egyhazi (1962, 1964) установяват количествено увеличение на мозъчната РНК и изменения на нуклеотидната последователност в нейната молекула. Хиден създава хипотезата за вътреневронно молекулярно кодиране на паметта (Хиден, 1964). Измененията в синтеза на РНК се съпровождат от промени в синтеза на белтъчните молекули. Характерът на тези изменения съответствува на честотната модулация на аферентните импулси, така че впоследствие белтъчната молекула може да „разпознае“ дразнения със същата честотна характеристика, в резултат на което тя се дисоциира и стимулира освобождаването на медиатор, облекчаващ провеждането на импулсите през синапса. Независимо от своите слабости тази хипотеза дава мощен тласък за по-нататъшно развитие на изследванията върху ролята на РНК и белтъците в процесите на паметта. Огромен е броят на работите, които сочат, че формирането на условните рефлексии се съпровожда от активация на РНК- и белтъчния синтез. Допускането, че консолидацията е свързана със синтеза на специфична за дадената памет РНК, подтиква към изследвания с „пренасяне на памет“ от обучени на необучени индивиди: възпроизвеждане на придобит опит у част от тялото на обучени планарии или у личинки на обучени насекоми, опити с пренасяне на памет от обучени на необучени животни с въпрыскване на хомогенат от мозъчна тъкан и пр. (по Крылов, 1979).

Представата за образуване в мозъка в процеса на обучение на специфични белтъци, допускани материални носители на паметта, насочва някои изследователи към тяхното изолиране и експериментално потвърждаване. Унгар изолира няколко различни пептида, индуцирани от обучението и имащи поведенческа специфичност: скотофобин (свързан с предаване на реакция на избягване тъмнина при плъхове), амелетин (свързан с привикване на плъхове към определен звук), хромодиопсин (определящ предпочитание или страх към даден цвят при златни рибки) и пр. (Ungar, Oseguera-Navarro, 1965; Ungar и сътр., 1972). Доказана е също поведенческата и химичната специфичност на тези белтъци (Унгар, 1977). Въз основа на тези резултати Унгар изгражда хипотезата „Един пептид — едно поведение“ (Ungar, 1974), според която възприемането на различни информации се съпровожда от синтеза на специфични белтъци, наречени „предизвикани трансмитери“ или „конектори“, които обезпечават спецификата на междуневронните връзки за дългосрочно съхранение на информацията. Тази хипотеза скоро се сблъсква с теоретични опровержения. Животът на РНК-молекулите, а следователно и на иРНК, върху която се осъществява белтъчният синтез, е по-кратък от продължителността на съхранение на информацията. Това предполага възпроизвеждане на измененията в нуклеотидната последователност и в следващите генерации молекули РНК, което не се потвърждава. Ето защо вниманието на изследователите се насочва към макромолекул-

ната триада ДНК—РНК—белтък, водеща роля при която се отдава на ДНК (Рыжков, 1965; Соколов, 1969, и др.). В основата на тази хипотеза стои способността на ЦНС да изменя качествено активността на ядрената ДНК, откривайки едни или други участъци от генома за синтез на специфична РНК (Крылов и сътр., 1965). Така постъпващата в мозъка онтогенетична информация реализира закодираната в молекулата ДНК филогенетична информация и по такъв начин генетичният апарат служи за основа на индивидуален опит. Този общ за всички тъкани механизъм има и своя специфика в мозъчните клетки. Има данни, че броят на откритите за синтез на РНК уникални последователности от нуклеотиди в нервните клетки превишава 3–5 пъти този в клетките на черния дроб, на бъбреците, на далака и пр. (Hahn и Laird, 1971). Именно този отдел на генома е отговорен за специфичния метаболизъм на клетката. Установено е също увеличаване на броя на откритите уникални кодони в генома на нервната клетка с възрастта (Крылов, 1979), което говори за нарастваща специализация и диференциация на невроните. Това е вероятният механизъм, който компенсира невъзможността на диференцираните нервни клетки при животните и човека да се делат в периода на онтогенетичното развитие.

Напоследък все повече автори търсят механизмите на съхранение на информацията в своеобразието и спецификата на морфофункционалната организация на ЦНС — факт, пренебрегван от привържениците на вътреневронното кодиране на информацията. Съгласно хипотезата за хемоспецифичността на Sperry (1963) невроните притежават маркери, по които се разпознават и се свързват за образуване на специфични проводни пътища в ембрионалния период, т. нар. протовериги. В процеса на онтогенезата се формират и нови синапсни връзки, метавериги, в които според Спери се записва информацията. Тази хипотеза е в съгласие с представата на редица автори, считащи, че нарастването на невронните израстъци и установяването на синаптичните връзки между тях съставлява същността на процесите на формиране на условните връзки. На базата на тези данни Меерсон и сътр. (1966) формулират хипотезата за ролята на взаимовръзката между генетичния апарат и физиологичната способност на невроните да изграждат многоневронни системи, съставляващи структурната основа на паметта. Съгласно тази хипотеза външните дразнители, действувайки на сензорните рецептори, пораждат аферентна импулсация, която предизвиква възникването на функционални констелации от интензивно функциониращи неврони в мозъка. Интензивните импулси активират генетичния апарат и увеличават синтеза на нуклеинови киселини и белтъци в неврона. Това предизвиква нарастване на невронните израстъци в дадената констелация и образуването на нови или заздравяването на съществуващите синапсни връзки между участващите в нея неврони. В резултат на това динамичният първоначално процес получава пластична обезпеченост

и функционалната констелация се превръща в структурна основа за дългосрочното съхранение на енграмата. Този възглед намира подкрепата на много автори: Hyden (1976), Бериташвили (1970), Кафиани (1970), Ильюченко (1972), Прибрам (1975), Маттиес (1972), Ott (1977), Bennett и сътр. (1979) и др. Pohle и Matthies (1971) и Pohle и сътр. (1979) установяват, че под действието на обучаващата тренировка усилено нараства синтезът на РНК в невроните на хипокампа и новата кора. Блокирането на синтеза на нуклеиновите киселини с рибонуклеази, актиномицин Д и др. преди обучението влошава консолидацията на информацията, но не повлиява добре усвоена условна реакция (Ильюченко, 1972; Гречин, 1976). Посочват се и противоречиви данни, получени с актиномицин Д (Wetzel и сътр., 1976). Слабият ефект на блокаторите на РНК-синтеза се свързва преди всичко с достатъчното количество на РНК в невроните на мозъка (Ильюченко, 1972).

Инхибиторите на протеинсинтезата пуромицин, циклохексамид, ацетоксициклохексимид, анизомидин и др. също влошават паметта на различни видове животни (Taber, 1971; McGaugh, 1973; Ott и Matthies, 1973; Bloom и сътр., 1977; Day и сътр., 1977; Quinton и Kramarey, 1977). Влошаване е установено при снижаване синтеза на нови протеини в мозъка с 80–90%. Механизмът на действие на тези блокатори е много сложен и все още неизяснен. Многобройни са и страничните им действия, което ги прави неудобни за експериментална работа (Matthies и сътр., 1973).

Стимулаторът на мозъчната РНК-полимераза — магнезиевият пемолин — активира синтеза на невронна РНК, облекчава изработването на условни реакции при плъхове и премахва амнезичния ефект на електроконвулсивния шок (Ильюченко, 1972). Plotnikoff (по Ильюченко, 1972) счита, че пемолинът повлиява и съхранението на информацията.

Предшествениците на РНК-пиримидиннуклеотидите, към които се отнасят уридин монофосфатът, цитидин монофосфатът, оротовата киселина и др., също подобряват съхранението на паметта (по Ott, 1977). Въведени в доза 0,558 мкмол и. ц. в. на плъх, тези вещества повишават мозъчното съдържание на РНК, както следва: уридин монофосфатът — след 16 ч, цитидин монофосфатът — след 48–144 ч, и оротовата киселина — след 4–48 ч (Роров и сътр., 1972). Предшествениците на РНК имат изразено подобряващо паметта действие, когато са въведени 1 час преди обучението. Установява се, че пиримидиннуклеотидите и оротовата киселина не повлияват обучението, но изразено подобряват запаметяването, забавят угасяването на условни реакции и отстраняват амнезичния ефект на електроконвулсивния шок. Счита се, че РНК-предшествениците най-вероятно подобряват дългосрочната памет, като предизвикват количествени и качествени промени в синтеза на РНК, което обуславя количествени и качествени промени в белтъчния синтез в мозъчните неврони (Matthies и сътр., 1973). Стимулатори на ЦНС потен-

цират подобряващия паметта ефект на оротовата киселина вероятно по пътя на предизвиканото с тях активиране на метаболизма в невронните протеини (Flood и сътр., 1977; Knoll, 1974; Yonkov и Roussinov (1981).

Като обсъжда участието на РНК в паметовия процес като стимулатор на насочен протеинов синтез в мозъчните неврони под влияние на възприетата информация, Матиес счита, че само в този смисъл на РНК може да се гледа като на тъй много търсената „молекула на паметта“ (Matthies и сътр., 1973). Според Матиес (Матиес, 1972) активността на синапсните контакти се регулира от вътреклетъчната система за регулация. Биохимичните процеси, съпровождащи синапсната активност, водят до промени в концентрацията и дислокацията на веществата, които се явяват за вътреклетъчната регулаторна система транспортни метаболити и преносители на информацията. Съгласно тази хипотеза са възможни няколко равнища на регулация. Кратковременните метаболитни промени и йонни придвижвания, породени от постъпилата на сензорния рецептор информация, определят синаптичната степен на регулация, считана за същност на краткосрочната памет, обратимите конформационни промени на структурните и ензимните белтъци определят синаптомалната степен на регулация, считана за същност на интермедиерната памет, и възникването на необратими количествени и качествени промени в белтъчния синтез определят ядрената степен на регулация, свързана с дългосрочното съхранение на паметовите следи.

Бородкин и Крауз (1978) създават синаптомембранната хипотеза за изясняване механизма на възникване и съхранение на паметовите следи. В основата на тази хипотеза стои представата, че краткосрочната памет е свързана с нестабилни конформационни изменения на белтъчните молекули само в областта на синапсите, докато при формирането на дългосрочната памет тези промени посредством кооперативни ефекти се разпространяват и върху мембранните комплекси на неврона, които са в състояние да съхранят придобитите устойчиви конформационни промени. Трябва веднага да подчертаем, че и двете посочени хипотези свързват молекулярните и морфофункционалните промени в ЦНС под влияние на новопостъпилата информация и комплексно разглеждат структурната основа на паметовата консолидация и съхранение.

4. Участие на мозъчните медиаторни системи в механизма на паметовото изграждане и съхранение

В механизма на регулация на синаптичната активност решаваща роля играят мозъчните медиаторни системи. Освен своята класическа медиаторна функция те участвуват в процесите на паметообразуването и с немедиаторни ефекти — регулация на белтъчния синтез на транскрипционно, транслационно и посттранслационно ниво (Штарк и сътр., 1974; Кометиани, 1976; Bloom, 1975; Greengard, 1976).

а) Холинергични механизми

Участието на холинергичните механизми в процесите на паметовото изграждане е свързано с възприемането и ранната консолидация на информацията (Ильюченко, 1972; Кругликов, 1981; Йонков, 1985). Матиес и неговите сътрудници (Matthies и сътр., 1974) установяват нарастване на свободната фракция на ацетилхолина в хипокампа по време на обучение при плъхове и нарастване на стабилносвързаната фракция на медиатора 2 часа след обучението. Четири часа по-късно авторите отчитат повторно нарастване на лабилносвързаната фракция ацетилхолин. Много автори свързват успешното запамятаване със синтеза на нови количества ацетилхолин и с нарастване на хипокамповата холинергична активност след тренировката (Glick и сътр., 1973; Jaffered и сътр., 1977). Прекомерното повишение или снижение на мозъчната концентрация ацетилхолин влошава възприемането и съхранението на информацията (Ильюченко, 1973). Така антихолинестеразните средства физостигмин, пиридостигмин, прозерин и фосфакол в малки дози подобряват, но във високи — вече влошават паметта при опитни животни (Ильюченко, 1972).

М-холиномиметиците ареколин, пилокарпин, треморин и др. в малки дози подобряват ретенцията (Ильюченко, 1972; Бородкин и Крауз, 1978). Н-холиномиметикът никотин в дози 0,02–0,5 мг/кг след обучение подобрява паметта при различни видове животни (Бошев, 1957; McGaugh, 1973; Castellano и сътр., 1973; Driscoll и Bättig, 1974, и др.). Допуска се влияние на никотина както върху холинергичните, така и върху норадренергичните структури на мозъка (Ильюченко, 1973; Селиванова и Голиков, 1975; Бородкин и Крауз, 1978, и др.).

М-холинолитиците атропин, скополамин, амизил, дитран, арпенал влошават обучението и паметта при различни видове животни и при различни модели на обучение (Van der Poel, 1974; Бородкин и Крауз, 1978), ускоряват угасяването на условни реакции (Hadzovic и Dewied, 1974) и предизвикват амнезичен ефект (Селиванова и Голиков, 1975). М-холинолитиците скополамин и атропин премахват подобряващия обучението и паметта ефект на централни стимулатори и премахват техния подобряващ хабитуацията на плъхове ефект (Йонков, Дисертация, к. м. н., 1984). Някои автори установяват липса на ефект и дори подобряване на паметта с холинолитици при следтренировъчно прилагане (McGaugh, 1973; Wetzel и Ott, 1977; Ott, 1977), което се обяснява със закъсняващия пик на действие на тези вещества, когато процесите на ранна консолидация са вече към своя край. Амнезичният ефект на М-холинолитиците се обяснява с блокиране на холинергичното предаване (Brunner и сътр., 1973) и снижаване активността на мозъчните холинергични структури (Петков, 1977), което и в двата случая препятствува възприемането на информацията и пълноценното протичане на консолидационните

процеси. Н-холиноблокери педифен, ганглерон, бета-етил дифацил, мекамиламин не повлияват или леко влошават изработването на условно-рефлексни реакции (Селиванова и Голиков, 1975; Бородкин и Крауз, 1978). Смесените М- и Н-холиноблокери спазмолитин, пентафен и др. подобряват или влошават паметовите процеси в зависимост от дозата (Ильюченко, 1972).

б) Катехоламинергични механизми

Много изследвания подкрепят виждането, че катехоламинергичните механизми на мозъка участват в регулацията на поведението, във формирането на условно-рефлексни реакции и на емоциите (Азарашвили, 1976; Громова, 1977; Бородкин и Крауз, 1978, и др.). Според Кругликов (1981) норадренергичната система на мозъка играе ролята на пусков механизъм за процесите на консолидацията и по-нататък оказва модулиращо влияние върху процеса на паметовото изграждане. Участието на допаминергичната медиация се свързва с регулирането на двигателната активност (Бородкин и Крауз, 1978) и със започването и протичането на реакцията за активно условно избягване и на оперативно поведение (Fibiger и сътр., 1976; David и сътр., 1977). Семенова и сътр. (1979) считат, че допаминергичната активност осигурява стабилността на паметовите следи. Jork и сътр. (1980) установяват, че апоморфинът повишава инкорпорацията на фукоза в гликопротеидите на хипокампа, и допускат участие на допаминергичните рецептори в биосинтетичните процеси на късната консолидация, като процесът е опосредствуван от промени в хипокампа. цАМФ.

Повечето данни говорят, че умереното повишаване на норадренергичната (David и сътр., 1977; Бородкин и Крауз, 1978; Азарашвили, 1981) и на допаминергичната активност в ЦНС (Ильюченко, 1972; Ott, 1979; Rosic и Overstreet, 1982; Ovtcharov и Petkov, 1983) подобрява обучението и/или ретенцията на информацията. Обратно, снижаването на норадренергичната (David и сътр., 1977; Bloom и сътр., 1977; Nauck и сътр., 1976; Yonkov и Roussinov, 1979) и на допаминергичната активност на мозъка (по Yonkov, 1984) влошава изразено паметовите процеси.

Като анализира данните за паметовите ефекти на средства, стимулиращи или потискащи мозъчната норадренергична и допаминергична активност, Азарашвили (1981) допуска, че значителни отклонения в нивата на катехоламините, а вероятно нарушаването на техните оптимални съотношения, влошават протичането на собствените механизми на паметообразуването. Така повечето данни сочат, че L-DOPA (допаминергичен прекурсор) не повлиява или дори влошава изработването и съхранението на условно-рефлексни реакции, което може да се обясни с изместване на съотношението ДА/НА в ЦНС в полза на доamina (по Георгиев, Овчаров, 1985).

Получени са убедителни доказателства за способността на катехоламините да променят хемореактивните свойства на невроните. Libet и сътр. (1975) установяват продължително задържащо се усилване на чувствителността на невроните по отношение на ацетилхолина под влияние на доamina. Интересна хипотеза за участието на холинергичните и моноаминергичните синапси в процесите на паметта е предложена от Matthies и сътр. (1978). Според нея активирането на специфичните сензорни входове, които имат холинергична природа, води до обратими конформационни промени на постсинапсната мембрана, повишаващи синапсната проводимост. Ако в течение на времето, докато съществуват тези конформационни промени, постъпят емоционално-мотивационни влияния, опосредствувани от моноамини, последните активират системата на цикличните нуклеотиди. В резултат на това се синтезират нови белтъци и полипептиди, които способствуват съхранението на получените вече конформационни промени. По такъв начин невронът придобива набор от синаптични входове с повишена ефективност, които обезпечават неговото участие в състава на енграмата.

Като изхожда от информационната теория за емоциите, Кругликов (1981) изказва предположението, че холинергичната система на мозъка обезпечават информационната съставка на процеса на обучение, докато ролята на моноаминергичните системи се свежда до обезпечаване на емоционално-мотивационната съставка.

Отдава се значение и на ролята на периферните катехоламини при паметовите процеси (Lanzi и Izquierdo, 1976; McGaugh и сътр., 1980; Martinez и сътр., 1980). Squire и Davis (1981) допускат, че те оказват модулиращо действие, като променят нивото на ретикуларната активация и по този начин повлияват процеса на консолидация.

Интересна хипотеза за ролята на катехоламините в ЦНС за формиране на паметта предлага напоследък Дини (1980). Той счита, че началният етап на обучението действа стресогенно върху организма и активира норадренергичната система в мозъка, която създава необходимия метаболитен фон за възникване на необходимите пластични промени, свързани с дългосрочното съхранение.

В заключение на този раздел може да се изтъкне спрегнатото взаимодействие на холинергичната с катехоламинергичните системи при формирането и съхранението на паметовите следи. При това водеща роля се отдава на холинергичната система (и най-вече на М-холинергичните рецептори) и се допуска, че норадренергичната и серотонинергичната система модулират пътищата на информация в главния мозък още на техните входни звена, като увеличават или снижават чувствителността на холинергичните синапси (Matthies, 1974; Кругликов, 1981; Il'yutchenok, 1982).

в) Серотонинергична система

Много автори установяват, че серотонинергичната система участва активно в реализацията на паметовите процеси (по Бородкин и Крауз, 1978). Посочва се, че повишаването на серотонинергичната активност на мозъка над определени граници с прилагане на 5-НТ или на неговия предшественик 5-хидрокситриптофан влошава възприемането и/или съхранението на информацията при различни тренировъчни задачи и различни видове опитни животни (Aprison и сътр., 1975; Азарашвили, 1976; Илюченко, 1972; Pizewlocki, 1975, и др.). Някои автори установяват подобрене на усвояването на хранителноподкрепените задачи и системно влошаване на наказателно подкрепените реакции. Громова (1980) обобщава тези данни и счита, че повишената мозъчна концентрация на серотонина подобрява емоционално положително подкрепените реакции. Кругликов (1978) обаче изтъква, че много данни подкрепят виждането за влошаване както на емоционално положително, така и на емоционално отрицателно подкрепените реакции при повишаване на мозъчното равнище на 5-НТ.

В литературата се посочват много данни за подобряване на обучението и ретенцията при снижаване на мозъчното равнище на 5-НТ с парахлорфенилаланин (PCPA) или с лезии на дорзалните и медиалните рафе-ядра в средния мозък (Taber, 1971; Илюченко, 1972; Neto и сътр., 1976; Köhner и Lorenz, 1978; Petkov, 1980; Yonkov и сътр., 1982). Съобщават се данни и за влошаващ ретенцията ефект на PCPA (по Köhner и Lorenz, 1978) при наказателно подкрепени задачи и на рафе-лезиите при хранително подкрепени задачи (Семенова и сътр., 1979). Счита се, че тези противоречия се дължат на разнообразието от тренировъчни постановки, степен на затвърдяване на задачата, използвани дози на веществата и пр. Противоречиви са и данните, получени с прилагане на средства, потискащи активността на серотонинергичните рецептори в мозъка (с морфин, LSD и пр.) (по Бородкин и Крауз, 1978). Противоречивостта на данните за влиянието на серотонинергичните средства върху процесите на обучение и памет дава основание на Илюченко (1973) да счита ролята на 5-НТ-ергичната система при паметовите процеси за все още неизяснена. Участието ѝ се свързва и с нейната роля в регулацията на белтъчния обмен на мозъка (Кругликов, 1979) и с повлияване баланса на реципрочно действащите задържаща серотонинергична и възбудна норадренергична системи на мозъка (Geyer и сътр., 1976; Громова, 1980). Счита се, че някакво оптимално равнище на мозъчната 5-НТ-ергична активност е от непосредствено значение за осъществяването на процесите на паметта: възприемане, консолидация, съхранение и възпроизвеждане на информацията (Гасанов и сътр., 1974; Бородкин и Крауз, 1978; Кругликов, 1981, и др.).

г) ГАМК-ергична система

Литературните данни характеризират гама-аминомаслената киселина като медиатор с предимно потискаща роля в ЦНС (Curtis и Johnston, 1974; Петков, 1977; Георгиев, 1980, и др.). Високоэффективен невронален транспорт на ГАМК, както и наличие на ГАМК-ергични рецептори са установени във всички части на централното сиво мозъчно вещество (по Enna, 1981). Пресинапсни ГАМК-ергични рецептори са установени върху пресинапсни окончания на различни мозъчни медиаторни неврони — норадренергични, серотонинергични, допаминергични, ацетилхолинергични и пр. (по Starke, 1981). На тази основа ГАМК вероятно осъществява модулиращото си действие върху ефектите на другите мозъчни трансмитерни системи.

Много данни сочат, че ГАМК широко взаимодейства с другите мозъчни медиаторни системи. ГАМК повишава освобождаването на норадреналин в мозъчната кора и хипоталамуса и на серотонин от средно-мозъчните рафе-ядра (по Георгиев, 1980) и потиска в повечето случаи освобождаването на допамина от стриатума (по Enna, 1981). Допуска се, че ГАМК активира холинергичните междинни неврони в стриатума, като снижава допаминергичния контрол над тях и потиска обратното поемане на ацетилхолина (Bianchi и сътр., 1982). Блокирането на ГАМК-ергичните рецептори (с пикротоксин) засилва отделянето на допамин от нигростриатните допаминергични окончания (по Huston и Staubli, 1978).

Разпространението на ГАМК-ергичните неврони и рецептори в почти всички структури на мозъка и широкото взаимодействие на ГАМК с другите мозъчни медиаторни системи отреждат съществена роля на този медиатор в регулацията и управлението на основните функции на висшата нервна дейност и вероятно на паметовите процеси.

Изследвания на Ishikawa и Saito (1978), Rayevski и Kharlamov (1983) и др. показват, че ГАМК вероятно участва във формирането и съхранението на паметовите следи. Повишаването на хипокампалната ГАМК-ергична активност подобрява ретенцията на плъхове с активен авоиданс задача (Grecksch и сътр., 1978), докато нейното снижаване я влошава (Grecksch и Matthies, 1981). На базата на тези резултати авторите допускат съществена роля на хипокампапалните ГАМК-рецептори в процесите на формиране и съхранение на паметта. От друга страна, резултатите, получени с периферно въвеждане на ГАМК-ергичните агонисти и антагонисти, имат често противоречив характер (Ishikawa и Saito, 1978; Yonkov и Georgiev, 1985).

В литературата има данни, че ГАМК участва активно в регулацията на въглехидратния, белтъчния и фосфолипидния синтез в нервната тъкан (Оја и сътр., 1977, цит. по Йонков, 1983). Предвид на тези данни и данните за взаимодействията на ГАМК с другите мозъчни ме-

диаторни системи с установено участие в механизмите на паметообразуването може да се допусне, че ГАМК участва в паметовите процеси най-вероятно като модулатор на мозъчната медиаторна активност и регулатор на невронните обменни процеси (Йонков, 1983).

5. Роля на мотивационно-емоционалната сфера при изграждането на паметовите следи

Механизмите на паметообразуването се подразделят на собствени (възприемане, фиксация, съхранение и възпроизвеждане) и регулационни (нивото на бодърстване, внимание, двигателна възбуда, емоционална напрегнатост, мотивация и пр.). Посочва се, че регулационните механизми участват предимно в процесите на възприемането и краткосрочната памет (McGaugh, 1973), но някои от тях, като емоциите, играят съществена роля и в по-късните фази на паметовото изграждане (Gold и McGaugh, 1975; Громова, 1977, 1980). Много данни подкрепят виждането, че характерът, видът, силата и биологичната значимост на тренировъчната задача, честотата и времетраенето на тренировките и др. играят определена роля за оптималното протичане на невробиологичните процеси на паметовото изграждане и съхранение (Dawson и McGaugh, 1973; Порох и сътр., 1976; Ott, 1977; Flood и сътр., 1977; Йонков, Дисертация, 1984). Допуска се, че постъпилата по време на обучението информация задвижва формирането на паметовите следи и се съпровожда от комплекс неспецифични физиологични реакции, чийто най-важен компонент са емоциите. Те от своя страна обезпечават закрепването на паметовите следи. Тази хипотеза на Gold и McGaugh (1975) намира подкрепата на редица други автори. Според Симонов (1979) емоционално възбуждение винаги съпровожда изработването на условнорефлексните реакции. Иlyutchenok (1982) смята, че паметта се регулира от емоциогенна и активизираща контролна система на мозъка. Емоциогенната система (амигдалният комплекс, преоптичната област, пери- и паравентрикуларните хипоталамични ядра, средномозъчното сиво вещество и др.), като повлиява активността на лимбико-ретикуларната система и новата кора, регулира и контролира паметовите процеси. Петков (1977) посочва, че холинергичната система има потискащо или активизиращо влияние върху различни страни на поведението и върху емоциите. Уопков (1985) установи, че централните стимулатори в дози, подобряващи обучението (и ретенцията), в периода след приключване на тренировката снижават двигателната активност и съществено подобряват показателите за емоционална възбуда на плъховете при тест „открито поле“.

Забележка: При съставянето на глава II/2 са ползвани материали, събрани и описани от Надежда Панушева от Института за изучаване на мозъка при БАН (Тема 1.3).

6. Участие на неuropeптиди в процесите на обучение и памет

Установено е влиянието на неuropeптите върху поведението на опитни животни. Неuropeптите, произлизащи от предната хипофиза (АСТН, бета-липотропин), повлияват предимно мотивационните процеси и обучението, докато неuropeптите на задния дял на хипофизата (напр. вазопресинът) играят модулираща роля в процеса на паметовото изграждане (Squire и Davis, 1981; De Wied и Jolles, 1982). Съществуват определени различия между ендокринните и поведенческите ефекти на неuropeптите. Поведенческите ефекти се наблюдават и от техни фрагменти, които нямат установена ендокринна активност. Поведенческите ефекти на неuropeптите се свързват с промените, които те предизвикват в метаболизма на мозъчните макромолекули и в протеинсинтеза (Ban, 1980).

АСТН повлиява комплексно поведенческите процеси — мотивацията, вниманието, реакцията на пробуждане, обучението и паметта. Посочва се важната роля на фрагмента АСТН₄₋₇ (Witter и сътр., 1981). По отношение на влиянието на този неuropeпид върху паметовите процеси е установено, че както цялата молекула АСТН, така и фрагментът АСТН₄₋₁₀, приложени преди обучаващата тренировка, забавят угасването както на положително, така и на отрицателно подкрепени тренировъчни задачи, премахват амнезиращия ефект на електроконвулсивния шок при хипофизектомирани животни. Поведенческите ефекти на родствените с АСТН пептиди са краткотрайни (Witter и сътр., 1981; Squire и Davis, 1981). De Wied (1977) допуска, че АСТН и подобни на него неuropeптиди имат краткотраен поведенчески ефект, докато вазопресинът оказва по-продължителен ефект. Witter и сътр. (1981) смятат, че АСТХ-пептидите подобряват главно обучението, докато алфа- и бета-меланоцит-стимулиращият хормон повишават вниманието. Допуска се също, че АСТН и родствените му пептиди повлияват възпроизвеждането на реакцията, а не консолидацията на паметовите следи (Bohus и DeWied, 1981). В противоречие с подобно виждане Gold и De Lapou (1981) намират, че АСТН, въведен скоро след тренировката, в зависимост от дозата подобрява или уврежда ретенцията. Това несъмнено говори за влияние на неuropeптите върху консолидацията и съхранението на паметта. Тези автори допускат двойствен механизъм на паметово въздействие за АСТН-подобните пептиди: модулиране на мозъчната невронна активност и потенциране освобождаването на норадреналина. Изглежда, паметовите им въздействия се реализират върху задните таламични структури, септално-хипокампалния комплекс, лимбико-средномозъчния кръг и др. (по Георгиев и Овчаров, 1985) — структури, известни с участието си във формирането и съхранението на дългосрочната памет.

ВАЗОПРЕСИН И ОКСИТОЦИН. Установено е, че вазопресинът и окситоцинът упражняват изразени ефекти върху поведението чрез пряко повлияване на мозъчните структури (по Георгиев и Овчаров, 1985). Има данни, че екстрахипоталамични пептидергични неврони завършват в различни лимбични и средномозъчни структури (Greidanus и сътр., 1981). Вазопресинът предизвиква дълготрайни ефекти върху поведението. Приложен след тренировката, вазопресинподобният пептид лизин-8-вазопресин удължава угасяването в течение на 3 дни, подобрява обучението на хипофизектомирани плъхове в шатъл-бокс и поддържа изпълнението стабилно в течение на една седмица след последното третиране. Приложени скоро след обучение, вазопресинът и подобните му пептиди подобряват ретенцията при тренирани с инхибиторен авоиданс задача плъхове (по Squire и Davis, 1981). Има също сведения, че вазопресин-подобните пептиди негативират амнезичния ефект на пуромидин, на CO₂, електрошок и пр. (De Wied, 1977). Тези експериментални данни ни дават основание да считаме, че вазопресин-подобните пептиди играят съществена роля в процесите на паметообразуването, като способствуват за паметовата консолидация или възпроизвеждането на паметовите следи.

Окситоцинът повлиява активното и пасивното условно избягване в обратна на вазопресина посока, т. е. има амнезиращо въздействие. Той повлиява както консолидацията, така и възпроизвеждането (Greidanus и сътр., 1981). Изследвания на Ermisch и сътр., (1985) установяват при плъхове „добри ученици“ при задача с активно условно избягване повишаване на аргинин-вазопресина и снижаване на окситоцина в хипокампа.

АНГИОТЕНЗИН II е главният компонент на ренин-ангиотензиновата система на мозъка. Той стимулира секрецията на вазопресина и алдостерона, а също и на ACTH (Printz и сътр., 1982; Reid, 1982). Установено е наличие на специфични ангиотензинови рецептори в различни части на мозъка: среден мозък, таламус, септум, хипоталамус, мозъчен ствол и пр. (Sirett и сътр., 1977).

Има данни, че ангиотензин II (AT II) предизвиква промени в редица поведенчески реакции на организма: апоморфин- и амфетамин-предизвиканото стереотипно поведение, поведението на плъхове в „открито поле“, гърчово-пристъпния праг и др. (Braszko и Wisniewski, 1976; Georgiev и Getova, 1983; Georgieva и Kambourova, 1984; Georgiev и сътр., 1984). Има данни за участие на AT II в процесите на паметовото изграждане и съхранение (Martinez и сътр., 1981). Установено е, че AT II в малки дози (0,1–0,5 мкг на плъх и. ц. в.) подобрява запаметяването при плъхове, тренирани с активен авоиданс задача при възвеждане както преди, така и след тренировката (Georgiev и Yonkov, 1985), което говори, че този неврпептид повлиява специфичните процеси на

паметовото изграждане. Sagen и Routtenberg (1981) установяват, че AT II, въведен в дорзалния неостриатум на плъхове, влошава изпълнението на задача с пасивно условно избягване. Очевидно използваните тренировъчни методики и начин на въвеждане на AT II са от значение за изявяването на едни или други негови ефекти върху паметта. Счита се, че паметовите ефекти на AT II не са свързани с взаимодействието му с вазопресина на мозъка (Baranowska и сътр., 1983). Подобряващият обучението и паметта ефект на AT II се свързва с взаимодействието на пептида със собствените му рецептори в мозъчните структури, участващи в процесите на паметообразуването и съхранение (Georgiev и Yonkov, 1985), както и с взаимодействието му с други мозъчни трансмитерни системи: холинергична, допаминергична, 5-HT-ергична и пр. (Baranowska и сътр., 1983; Squire и Davis, 1981; Yonkov и сътр., 1986).

ОПИОИДНИ ПЕПТИДИ. В централната нервна система са установени две опиоподобни пептидергични системи. Едната е съставена от мет- и левенкефалини, а другата — от бета-ендорфин и е разположена в хипоталамо-хипофизната ос с излъчвания към таламуса, средния мозък, продълговатия мозък и понса. Енкефалините и ендорфините са ендогенните лиганди на опийните рецептори, които са установени в най-висока концентрация в лимбичната система (Георгиев и Овчаров, 1985). Ролята на енкефалините и ендорфините като невромедиатори или невромодулатори все още не може да се счита за изяснена (Петков, 1985).

Установено е амнезиращо действие на опиоидните пептиди върху процесите на паметта. В. Петков (1985) счита този техен ефект като позитивен адаптогенен фактор, предпазващ организма от натрупване на излишна информация. Izquierdo (1982) установява, че бета-ендорфинът, въведен и.п. веднага след обучението, предизвиква ретроградна амнезия. Налоксонът премахва този негов ефект, което говори за специфичното участие на опийните рецептори в процесите на паметта. Субаналгетични дози морфин, мет- и левенкефалини също предизвикват амнезия за различни тренировъчни задачи (Izquierdo, 1979; Lucion и сътр., 1981). Izquierdo (1982) свързва амнезичния ефект на морфина, мет-, лев- и дес-тир-мет-енкефалина поне отчасти с ефекта на бета-ендорфина, тъй като изброените енкефалини освобождават бета-ендорфина от диенцефалона на плъха. Също така авторът наблюдава снижаване на бета-ендорфиноподобната имунореактивност в мозъка на плъх в края на 25-минутно обучение, което обяснява с освобождаване и последващо разграждане на бета-ендорфина. Допуска се, че амнезичният ефект на електроконвулсивния шок се дължи на масивно освобождаване на бета-ендорфин и мет-енкефалин от хипоталамуса и други части на мозъка и неговият амнезичен ефект напълно се блокира с налоксон — блокатор на опийните рецептори в мозъка.

В. Петков (1985) посочва същественото адаптогенно действие на

бета-ендорфина при процесите на паметта. От една страна, той не пречи на аквизицията и фактически я подпомага, но препятства избирателно консолидационните процеси. Вероятно ролята на опиоидните пептиди е свързана с бързото забравяне на по-малко значими събития. От друга страна, както изтъква Izquierdo (1982), бета-ендорфиновото потискане на консолидацията отслабва при задачи, усвоени с интензивно и специфично подкрепление.

МЕТОДИКИ В ОБЛАСТТА НА БИОХИМИЯТА И МОЛЕКУЛЯРНАТА БИОЛОГИЯ И ТЯХНОТО ВНЕДРЯВАНЕ ЗА НУЖДИТЕ НА ПРОГРАМАТА

Л. Венков — Институт за изучаване на мозъка при БАН

1. УВОД

Нервната тъкан е изградена от клетки и структури с различна морфологична и метаболитна характеристика, различна степен на диференциация и специфични биологични функции. Тези особености определят методичните подходи и набора от методики, които се прилагат при изучаването на биохимичните процеси, протичащи в нервната тъкан. Подходът, при който се използват тотални хомогенати, не задоволява вече експериментаторите. Такъв подход не позволява да се изучават метаболитните взаимоотношения между отделните клетъчни видове, техните специализирани структури и други елементи (невронални клетки, глиални клетки, аксони, синапси, миелин, мозъчни съдове и др.). Известно е, че глиалните клетки са почти десет пъти повече от невроналните. От това се налага изводът, че при използването на тотални хомогенати се получават резултати предимно за метаболизма на глиалните клетки. Възможно е това да е причината, поради която при различни функционални състояния и патологични процеси, засягащи невроните, не се установяват биохимични промени, макар че такива съществуват. С такъв подход не е възможно и успешното изучаване на функционалната единица „неврон—глия—капиляр“. Преодоляването на посочените недостатъци стана възможно след разработването на нови методични подходи. Ще се спра на някои от тях, на техните предимства и недостатъци.

1.1. Цитоспектрофотометрия

Методичен подход, който позволява количествено измерване на ня-

кои вещества в клетката на хистологични срези. Основава се на работите на Caspersson (1950, 1955), който прилага основния закон на абсорбционната спектрофотометрия (закон на Бугер—Ламберт—Бер). Предимствата на този подход са, че чрез него могат количествено да се изучават различни вещества в отделни клетки. Недостатъците са, че при обработката на препаратите за цитоспектрофотометрия се губи голям процент от изучаваното вещество и е възможно определянето на ограничено число химически компоненти на клетката (общо количество на ДНК, РНК, белтък, някои радикали от белтъчната молекула). Първоначално се правеха оптимистични прогнози за този подход, като се считаше, че ще бъдат намерени подходящи багрила, с които ще се определят различните химически съставки на нервните клетки. За съжаление тези прогнози не се оправдават.

1.2. Микрохирургия

Този методичен подход се основава на изрязването на отделни клетки от нервната тъкан, които се подлагат на биохимичен анализ или могат да се съхраняват като преживяващи клетъчни култури. Прилагането на този подход доведе до разработването на ултрамикрометодики, които са разглеждани подробно в книгата на Osborne (1974). Мненията за достоинства на този подход са противоречиви. Овладяването на нужните ултрамикрометодики изисква специално оборудване и голяма сръчност. С изключение на електрофорезата в капилярки в нашите изследвания такива методики не се прилагат. Те имат редица недостатъци: възможност за допускането на не малка грешка при работата със свръхмалки количества; нарушаване целостта на мембраните на дисецираните клетки; трудности при отстраняването на контаминиращия материал и т. н. Подробна критика може да се намери в обзорите на Rose (1969) и Певзнер (1972).

1.3. Получаване на обогатени фракции на елементи, изграждащи нервната тъкан

Историята, основите и описанието на най-често прилаганите методики при използването на този подход се съдържат в книгите на Jones (1976) и Венков (1980, 1983). Поддържам мнението, че разработването на методики за получаване на отделни морфологични елементи от нервната тъкан в задоволително чист вид, достатъчно количество и със запазена биологична активност е едно от новите и може би най-перспективни методични направления на съвременната невробиохимия. Този методичен подход позволява и получаването на органели (клетъчни ядра, митохондрии, микрозоми, различни мембранни структури, синаптозони, синаптични везикули, елементи на мозъчните капиляри, миелин и др.) от обогатените фракции. Подходът намира

приложение при изпълняваните от нас задачи, включени в Програмата. Работата с обогатени фракции, получени от нервна тъкан, също има недостатъци. Макар че се използват изотонични среди, съхраняващи структурата и биологичната активност на изолираните елементи, има известна загуба на разтворимата съставка на клетките.

1.4. Други методични подходи

Накратко ще разгледаме и други методични подходи, които се прилагат за изучаване биохимията на нервната тъкан. Някои от тях дават косвени данни за метаболизма и състоянието на нервната система, а други се прилагат не така често поради методични трудности.

Анализ на биологични течности (кръв, урина, цереброспинална течност) — чрез прилагането на широк набор от клиничкохимични методики се получават косвени данни за състоянието на нервната система и целия организъм. Този подход е особено полезен при диагностиката на заболявания на нервната система и при оценяване ефекта на различни лекарствени средства.

Повреждане на мозъка — разрушават се определени участъци на мозъка, които се локализируют с помощта на стереотаксична апаратура. По-средством този подход Heller и сътр. (1962) са изучили локализацията и обмяната на моноамините в мозъка.

Перфузия на мозък на гръбначни — свързана е с много трудности. След перфузията се установяват промени в ЕЕГ и променено усвояване на глюкозата от мозъка. Не се препоръчва като адекватен методичен подход.

Перфузия на мозък на безгръбначни — този подход се счита за особено ценен, тъй като препаратът съхранява своята функционална активност в продължение на часове. С този подход са получени ценни данни за метаболизма на ацетилхолина от McIntosh (1963).

Перфузия на спинални ганглии — използва се за изучаване на синтеза и освобождаването на ацетилхолина и метаболизма на редица макромолекули при различни експериментални условия, например под влиянието на електрическо дразнене, добавянето в перфузиращата среда на различни йони, ензими и т.н.

Регионално канюлиране (разработено е от Feldberg, Lotti — 1967) — може да се прилага при различни животни. Използват се две канюли — през едната се вкарват различни вещества, а през другата се вземат проби за изследване.

Преди да разгледаме биохимичните методики, които вече се прилагат за изпълнение на задачите от Програмата, както и методиките, които е необходимо да бъдат въведени, бих искал да се спра на понятията неврохимични методики и методики на молекулярната биология.

Неврохимични методики. Всички методики, които дават директни данни за биохимията на нервната тъкан, могат да се нарекат невро-

химични методики. Препаративното ултрацентрифугиране е методика, която има широко приложение в биохимията, но се нарича неврохимична, когато се използва за получаване на обогатени фракции на елементи, изграждащи нервната тъкан. Различните видове електрофоре-за също са биохимични методики, но приложени за разделяне на макромолекули и други вещества, изолирани от нервната тъкан, стават неврохимични методики. Същото може да се каже за хроматографските методики, ензимните методики, методиките, с които се определят различните медиатори, и т. н. Специфичните особености на неврохимичните методики се определят от вече посочената морфологична и метаболитна нееднородност на нервната тъкан. Може би тук е мястото да се отбележи, че наборът от методики би следвало да се определя от поставените задачи, материалната база и равнището на неврохимичната наука, а не само от вече усвоените методики.

Методики на молекулярната биология. Молекулярната биология изучава нуклеиновите киселини и белтъците в живата природа и тяхното биологично значение. Всички методики, които допринасят за разрешаването на проблемите на молекулярната биология и чрез които се изучават нуклеиновите киселини и белтъците, са методики на молекулярната биология. През последните години методиките на молекулярната биология бяха разширени с прилагането на моноклоналните и хибридомните техники, които позволиха картирането на участъци от генетичния апарат и станаха основа на стратегическото направление в биологията — биотехнологиите на основата на рекомбинантна ДНК. Новите успехи на молекулярната биология вече намират място при изучаването на нервната тъкан. През 1985 г. на X конгрес на международното дружество по неврохимия в Рива дел Гарда Нума от Япония в доклада си съобщи за осъществен синтез на белтъците на ацетилхолинови рецептори и натриевите канали чрез използването на рекомбинантна ДНК-техника. Все пак прави впечатление, че на авторитетни биохимични конгреси все още се дискутира каква трябва да бъде стратегията при използването на постиженията на съвременната молекулярна биология в изследване на нервната тъкан (Marchbanks, 1985). Посочва се, че проблемът е много труден, изисква инвестиции за създаването на скъпа материална база, както и наличието на подготвени кадри с опит в областта на неврохимията.

2. БИОХИМИЧНИ МЕТОДИКИ, ВЪВЕДЕНИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ЗАДАЧИ ОТ ПРОГРАМАТА

2.1. Методики за получаване на обогатени фракции на елементи, изграждащи нервната тъкан

Основават се на прекарването на нервната тъкан през сита с под-

ходящи размери на порите, което позволява предварително дезинтегриране на тъканта, като по този начин механичните увреждания се свеждат до минимум. Следва центрофугиране в индиферентни среди с различна плътност, при което се получават фракции, обогатени (80–90%) на желаните елементи, които са с много добре запазена структура и биологична активност.

Получаване на фракции, обогатени на неврони и глия. Тези методики позволяват да се получат фракции, обогатени предимно на глиални или невронални клетки. От тях могат да се изолират различни клетъчни органели (ядра, митохондрии, лизозоми, плазматични мембрани, микрозоми и др.).

Получаване на синаптозоми. Изучаването на механизмите на холин-ергичното предаване на нервните импулси се издигна на ново равнище, след като се разработиха методики за получаване на мозъчни фракции, обогатени на синаптични структури, наречени синаптозоми. Тези фракции са особено подходящи за изучаването на механизма на действие на различни невротропни вещества и лекарствени средства.

Получаване на миелинова фракция. Получаването на пречистена миелинова фракция дава възможност за изучаване на нейния специфичен белтъчен и липиден състав. Идентифицирането и количественото определяне на индивидуални белтъци и липиди правят възможно проследяването на промените, настъпващи в процеса на развитие на мозъка, в процеса на обучение, при различни заболявания и въздействия.

Получаване на капилярна фракция от централната нервна система. При прилагането на тези методики се получават мозъчни капиляри с размери до 300 мкм. Изучаването на активността на някои ензими в тази фракция може да допринесе за изясняването на взаимоотношенията във функционалната единица на мозъка „неvron–глия–капиляр“, както и на механизмите на транспорт на вещества през стените на терминалните съдове.

Получаване на синаптични мембрани от инервационната зона на диафрагма. Методиката е разработена в Централната лаборатория по регенерация при БАН и позволява изучаването на нервно-мускулни синапси и биохимичните промени в норма и експеримент.

Получаване на ядра от невронални и различни глиални клетки. Тази методика позволява получаването на ядра от невронални клетки, олигодендроглия и микроглия. Методът е разработен специално за Програмата и ще служи за изучаване на синтеза на нуклеиновите киселини и ядрените белтъци в тези клетки при функционалните модели, които използваме.

2.2. Методики за изучаване на белтъци в нервната тъкан

Количествено определяне на белтъци. Използват се три методики за количествено определяне на белтък – два варианта на Lowry и сътр. (1951) за разтворими и неразтворими белтъци с чувствителност от 10 до 100 мкг и методиката на Bradford (1976) с добра чувствителност от 1 до 80 мкг. Последната методика е по-бърза и по-малко се влияе от странични фактори.

Изолиране и пречистване на белтъци. Изолирането и пречистването на белтъци от нервната тъкан се извършва чрез: изсолване, йонно-обменна хроматография, елуиране от електрофореграми и др.

Характеризиране на белтъци: различни видове електрофореза (едномерна върху хомогенни или градиентни гелове, върху цилиндрични гелове, върху плаки, двумерна, изоелектрично фокусиране, нативна електрофореза с последващо проявяване на ензимна активност); оцветяване на малки количества белтък върху електрофореграми със сребърни съединения, което позволява да се прояви белтък в концентрация от 10 до 50 пъти по-малка от 0,25 мкг; прехвърляне на белтъци от полиакриламидни плаки върху нитроцелулозна хартия (блотинг); идентифициране на индивидуални белтъци върху „блотове“ с помощта на лектини и специфични антисеруми; количествено денситометриране на електрофореграми с помощта на денситометър с електронен интегратор и принтер-плотер и използване на индивидуален компютър; изучаване метаболизма на белтъците чрез прилагането на белязани аминокиселини и количествена оценка с помощта на точна сцинтилация.

2.3. Изучаване на нуклеиновите киселини в нервната тъкан

Използват се методики, които дават възможност за количествено определяне на ДНК и РНК; техният синтез с помощта на предшественици, белязани с радиоактивни изотопи; характеризирани на различните видове РНК с помощта на електрофореза върху гелове от агарурей (техника, адекватна при изучаването на зреещото на рибозомална РНК); определянето на ензимни системи, отговорни за синтеза на ДНК и РНК (ДНК-зависима РНК-полимераза, ДНК-зависима ДНК-полимераза, различни форми на ДНК-полимеразата). Тези методи имат решаващо значение при изучаването на развитието на нервната тъкан и факторите, които повлияват това развитие.

2.4. Изучаване на липидите и мастните киселини в нервната тъкан

Значителна част от методиките, които се прилагат за изучаване

на липидите в нервната тъкан, за изпълнение на задачите, свързани с Програмата, са публикувани в книгата на Венков и Дишкелов (1985). Тези методики се отнасят до екстрахиране на общи липиди; количествено определяне на фосфолипиди, холестерол, неутрални липиди; разделяне на основните групи липиди и определяне на техния мастнокиселинен състав с помощта на тънкослойна, колонна и газова хроматография. При изучаване на мозъчните липиди се прилагат и радиоизотопни методики.

2.5. Определяне на медиатори и рецептори в нервната тъкан

Като се има предвид ролята на медиаторите и рецепторните системи за специфичните функции на мозъка, са усвоени и се прилагат следните методики: определяне на ацетилхолин; определяне на норадреналин, серотонин, допамин, хистамин, ацетилхолинови рецептори, серотонинови бета-адренергични и енкефалинови рецептори. Всички посочени методики се прилагат директно за мозъчна тъкан и фракции, изолирани от нея.

2.6. Ензимни методики за изучаване на нервната тъкан

Освен описаните в раздел 2.3 методики, имащи значение за метаболизма на нуклеиновите киселини, се прилагат и редица други ензимни методики, като: количествено определяне на ацетилхолинестераза, ацетилхолинсинтетеза, моноаминооксидаза, активираща се от натриеви и калиеви йони АТФ-аза, гама-аминотрансептидаза, алкална фосфатаза, лактатдехидрогеназа, сукцинатдехидрогеназа, малатдехидрогеназа, фумараза и множествени форми на много от посочените ензими. По-подробна информация може да се намери в книгата на Венков (1980).

2.7. Радиоимунни методики за изучаване на нервната тъкан

През 1985 г. са въведени няколко методики за определяне на простагландини и бета-ендорфини в мозък на експериментални животни.

Дотук разгледахме биохимичните методики, прилагани по проблем I от Програмата.

2.8. Клинико-биохимични методики

При изпълнението на задачите на три проблема от Програмата (IV, V, VI) се прилага широк набор от клинико-биохимични методи-

ки. Тези методики дават добра информация за общото състояние на организма при различни функционални състояния и патологични процеси, също така дават косвена информация и за състоянието на нервната система. Те могат да служат и за оценка на приспособителните възможности на организма и нарушението на хомеостазата в трудовия процес и спорта.

2.8.1 Изучаване на биохимични показатели на кръвта

Наред с рутинните методики за изучаване на еритроцитите, левкоцитите, тромбоцитите, фибриногена, общия белтък, утаяването на еритроцитите и др. за целите на Програмата се прилагат методики, които позволяват да се правят изводи за хуморалния имунен отговор на организма и плазмения вискозитет (имуноглобулини), оценка на реакцията на организма след интоксикация (протеазни инхибитори, макрогобулин, антитрипсин), прилагане на диети и лекарствена терапия (агрегация на тромбоцитите). Прилагат се методики и за изучаване на някои представители на липидите в кръвта (холестерол, триглицериди и др.), които дават информация за рискови състояния на организма и повишена атерогенеза. В кръвта се определят и ензими от групата на оксидоредуктазите, естеразите, трансферазите и лигазите, както и някои хормони. Определят се и концентрациите на някои йони (калиеви, натриеви, хлорни) и др.

2.8.2. Изучаване на биохимични показатели на урината

Методиките, които се прилагат за установяване промените на тези показатели, са насочени предимно към изучаване на кетостероидите и катехоламините в урината. Техните промени са важен показател за състоянието на хипоталамо-хипофизо-надбъбречната система при различни трудово-физиологични и екстремни състояния на организма и допринасят за проследяване и изучаване на неговите приспособителни способности.

3. БИОХИМИЧНИ МЕТОДИКИ, КОИТО СЕ ПРЕДВИЖДА ДА БЪДАТ ВЪВЕДЕНИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ЗАДАЧИТЕ ОТ ПРОГРАМАТА

Методичното обогатяване на научноизследователския процес се определя от неговите резултати. Често се налага въвеждането на но-

ви и непредвиджани методики и подходи. Това ме кара да изкажа мнението си, че е много трудно да се направи прогноза за най-необходимите нови методики за целите на Програмата. Ръководителите на отделните проблеми, в които се прилагат биохимични методики, имат известни виждания, които се свеждат до издигане на методичното равнище на основата на поставените задачи.

В методичната стратегия на Програмата трябва да се имат предвид постиженията на молекулярната биология през последните години и да се търси тяхното практическо приложение в профилактиката, диагностиката и лечението. Трябва също така да се усъвършенствуват подходите за изучаване на специализираните функции на мозъка и участието в тях на функционалната единица „неврон—глия—капилар“. Методичното равнище трябва да се издига и чрез насочено прилагане на компютърна техника за автоматизиране на научноизследователския процес и обработка на научните данни. Предвижда се и по-широко въвеждане на радиоимунни методики. В близко бъдеще за целите на Програмата се предвижда да се въведат следните нови методики:

Проблем I — определяне на свободни пиримидинови нуклеотиди; изолиране на поли (А)-РНК в отделни РНК-фракции; изолиране на активни транскрипционни комплекси от ядрена фракция, получена от мозък; характеризиране на индивидуални мозъчни белтъци с помощта на пептидни карти; сребърно оцветяване на микроколичества белтък (под 0,25 мкг); прехвърляне на белтъци от полиакриламидни плаки върху нитроцелулозна хартия (блотинг); специфично идентифициране на белтъци с лектини или имуноблотинг; определяне на рецептори в мозък чрез течна хроматография; радиоимунен анализ (при определяне на биологично активни субстанции); ензимно-имуносорбентен метод (ЕЛИЗА); радиоензимен метод за катехоламини.

Проблем IV — радиоимунни методики за определяне на редица хормони и медиатори в кръв и урина.

Проблем V — прилагане на редица ЕЛИЗА или радиоимунни методики за определяне на тромбоцитен фактор 4, бета-тромбоглобулин, тромбоцитен растещ фактор, антиромбин 3, апополипротеини и други методики за изучаване на липидния състав на мембрани от кръвни клетки.

Проблем VI — методики за изучаване изоензимите на лактат-дехидрогеназата и креатинфосфокиназата, както и радиоензимен метод за определяне на епинефрин и норепинефрин.

Новите методики, които ще се въведат, ще позволят да се издигне още повече равнището на биохимичните изследвания на мозъка, както и да се разширят възможностите за оценка на функционалното състояние на организма и неговите адаптивни механизми.

4. КАДРИ, РАБОТЕЩИ С БИОХИМИЧНИ МЕТОДИКИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ЗАДАЧИТЕ ОТ ПРОГРАМАТА, И НЕОБХОДИМИ БЪДЕЩИ СПЕЦИАЛИЗАЦИИ

Около 30 научни сътрудници, аспиранти, специалисти с висше и средно образование участвуват в прилагането на неврохимични, биохимични и клинично-биохимични методики за целите на Програмата. По-голямата част от тях са с висока квалификация и дългогодишен опит. Трима са доктори на науките, трима са професори или старши научни сътрудници I степен, четирима са старши научни сътрудници II степен или доценти и седем са кандидати на науките. Този състав е в състояние да преодолява методични трудности от всякакъв характер. За поддържане на необходимото методично равнище е необходимо изпращането за специализация на млади перспективни кадри по следните направления: биохимия на развиващия се мозък (1 специалист за 1 година), биохимия на холинергичния синапс (1 специалист за 1 година), биохимия на адренергичния синапс (1 специалист за 1 година), приложение на съвременните методики на молекулярната биология в изучаването на мозъка (2-ма специалисти за по 1 година), съвременни радиоимунни техники за изучаване функциите на мозъка (1 специалист за 1 година) и приложение на радиоимунните методики за целите на клиничната биохимия (2-ма специалисти за по 1 година). Специализациите да се реализират в страни с традиции в областта на неврохимията, молекулярната биология и клиничната биохимия (СССР, Франция, Англия, Япония, САЩ и др.). Добре е да се осигурят също така краткосрочни командировки и на хабилитирани участници в Програмата с продължителност 2—3 седмици. Това ще даде възможност за създаване на реални условия за международно сътрудничество по задачи на Програмата и популяризиране на получените научни резултати. Добра форма за повишаване на методичната квалификация може да бъде и организирането на курсове с участието на поканени лектори.

5. НАЛИЧНА И НЕОБХОДИМА МАТЕРИАЛНА БАЗА ЗА ПРИЛАГАНЕ НА ВЪВЕДЕНИТЕ МЕТОДИКИ И ВНЕДРЯВАНЕТО НА НОВИ

Всички въведени методики се прилагат благодарение на наличната материална база на научните звена, изпълняващи Програмата. Същото се отнася и до текущите консумативни материали, химикали, изотопи, серуми и др. Въпреки че това е една от положителните страни на

създадения програмен колектив за „Изучаване на човека и неговия мозък“, трябва да се намерят пътища за преодоляване на съществуващите трудности, свързани с въвеждането на нови методики, за което е необходима нова и съвременна материална база. Така например вече втора година по Програмата не е внесен нито един от заплануваните апарати с изключение на пишещи машини и персонални компютри „Правец 82“. Не са внасяни и необходимите реактиви и изотопи, което сериозно затруднява прилагането и въвеждането на нужни за биохимичните изследвания методики. Трябва категорично да се промени системата за планиране и доставяне на апарати и химикали, в противен случай изпълнението на биохимичните задачи от Програмата сериозно ще изостане.

Какви нови апарати изискват методиките, които се предвиждат за внедряване: проблем I — ултрацентрифуга (заявена 1985 г.), сцинтилационен брояч (заявен 1986 г.), спектрофотометър (заявен 1986 г.), сканиращ фотометър, апарат за високоволтова електрофореза, течен хроматограф, лиофилизатор за малки обеми, минусови хладилници; проблем IV — гама-брояч; проблем V — течен хроматограф, апарат за изоелектрофокусиране; проблем VI — гама брояч (заявен 1985 г.), течен хроматограф, лабораторни центрофуги.

6. ИЗВОДИ И ПРЕПОРЪКИ

6.1. За целите на Програмата се прилага широк набор от неврохимични, биохимични, молекулярно-биологични и клинично-биохимични методики. В по-голямата си част методиките са съвременни и адекватни на задачите, поставени в Програмата.

6.2. За издигане методичното равнище на биохимичните изследвания се предвижда въвеждането на нови методики на основата на постиженията на съвременната неврохимия, молекулярната биология и радиоимунологията.

6.3. При обработката на експерименталните данни успешно се прилагат възможностите на персоналния компютър „Правец 82“, но се чувства недостиг на специализирани програмни продукти.

6.4. Въведените методики се използват с помощта на съществуващата материална база на институтите, участващи в изпълнението на Програмата. Собствената материална база, с която разполага Програмата, все още е незначителна.

6.5. Кадрите, които използват биохимичните методики, са ви-

сококвалифицирани, но се налага спешно изпращане на дългосрочни специализации на млади кадри, както е посочено в раздел 4 на настоящия доклад.

6.6. Ръководството на Програмата да организира методични курсове с поканени лектори по най-перспективните методични направления в изучаване биохимията на мозъка.

6.7. Решително да се промени системата за доставяне на апаратура и необходимите реактиви и изотопи, за да се повиши срочността и сигурността на доставките.

6.8. Да се създадат условия за интеграция между научните колективи, използващи близки методични подходи.

Докладът е изготвен със съдействието на: Н. Цанева, Е. Цветанова, Д. Джарова, Ю. Попова, Ц. Тенчева и И. Досева, Е. Кирацов, А. Дишкелов, Л. Казаков и В. Пъчев.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. В е н к о в, Л. Множествени форми на ензими в нервната тъкан. БАН, София, 1980.
2. В е н к о в, Л. Получаване на обогатени фракции на елементи, изграждащи нервната тъкан. Съвременни проблеми на невроморфологията. Том 11, БАН, София, 1983.
3. В е н к о в, Л., А. Д и ш к е л о в. Липиди в нервната тъкан. Съвременни проблеми на невроморфологията. Том 16, БАН, София, 1985.
4. П е в з н е р, Л. З. Функциональная биохимия нейроглии. Наука, Ленинград, 1972.
5. А с k m a n, R. Gas-liquid chromatography of fatty acids and esters. General analytic methods. Vol. 2, Pergamon Press.
6. B r a d l e y, P. Methods in brain research. John Wiley & Sons, London—New York—Sydney—Toronto, 1975.

7. Caspersson, T. Cell growth and cell function. New York, 1950.
8. Caspersson, T. Quantitative cytochemical methods for the study of cell metabolism. *Experientia*, 11, 1955, 45-60.
9. Feldberg, W., V. J. Lotti. Temperature responses to monoamines and an inhibition of MAO-injected into the cerebral ventricles of rat. - *Brit. J. Pharmacol.*, 31, 1967, 152-161.
10. Fraied, R. Methods of neurochemistry. Marcel Dekker, INC., New York, 1972.
11. Haller, A., J. A. Harvey. A demonstration of a fall in brain serotonin following CNS lesions in rat. *Biochem Pharmacol.* 11, 1962, 859-880.
12. Hames, B. D., D. Rickwood. Gel electrophoresis of proteins, IRL Press, London-Washington, 1981.
13. Jones, D. G. Synapses and synaptosomes. Chapman and Hall, London, 1976.
14. Marchbanks, R. M., J. H. Robins. Strategies for the application of molecular genetics to mental illness. *J. Neurochem.*, 44, 1985, S42, A.
15. Maurer, H. R. Disc electrophoresis and related techniques of polyacrilamide gel electrophoresis. Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1971.
16. McIntosh, F. C. Synthesis and storage of acetylcholine in nervous tissue. - *J. Biochem. Physiol.*, 11, 1963, 2555-2570.
17. Numa, S. Molecular dissection of acetylcholine receptor and sodium channel. - *J. Neurochem.*, 44, 1985, S1, A.
18. Osborne, N. Microchemical analyses of nervous tissue. Pergamon Press, Oxford-New York-Toronto, 1975.
19. Rickwood, D. Centrifugation: a practical approach. IRL, London-Washington, 1978.
20. Rose, S. P. R. Neurons and glia: separation techniques and biochemical interrelationships. In: *Handbook of neurochemistry*. Vol. 2, New York, 1969, pp. 183-193.

СПИСК

НА БИОХИМИЧНИТЕ, МОЛЕКУЛЯРНОБИОЛОГИЧНИТЕ
И КЛИНИКО-БИОХИМИЧНИТЕ МЕТОДИКИ, ПРИЛАГАЩИ СЕ
ЗА ЦЕЛИТЕ НА ПРОГРАМАТА

ПРОБЛЕМ I:

1. Получаване на фракции, обогатени на неврони и глия, по методиката на Rose (1967). - *Biochem. J.*, 102, 33-43.
2. Получаване на фракции, обогатени на неврони и глия, по методиката на Hemminki (1970). *FEBS Letters*, 99, 290-293.
3. Получаването на фракции, обогатени на неврони и глия, по методиката на Hemminki и Holmila (1971). *Acta Phys. Scand.*, 82, 135-142.
4. Получаване на фракции, обогатени на неврони и глия, по методиката на Norton и Poduslo (1970). *Science*, 167, 1144-1146.
5. Получаване на фракции, обогатени на неврони и глия, по методиката на Sellinger и др. (1971). *Nature*, 230, 235-256.
6. Получаване на фракции, обогатени на неврони и глия, по методиката на Venkov и Roussanov (1974). *Proc. Symp. Magdeburg*, 1974.
7. Получаване на синаптозоми по методиката на Gray и Whittaker (1962). - *J. Anat.*, 96, 79-88.
8. Получаване на синаптозоми по методиката на De Robertis и др. (1963). - *J. Neurochem.*, 10, 225-235.
9. Получаване на синаптозоми по методиката на Venkov и Velitchkova (1976). *C. R. Acad. bulg. Sci.*, 29, 1211-1214.
10. Получаване на синаптични мембрани от нервномускулни синапси по методиката на Venkov и Kirazov (1984). *Cell. Mol. Biol.*, 30, 345-352.
11. Получаване на ядрена фракция от мозъчна кора по методиката на Hadjiolov et al. (1965). - *J. Cell. Biol.*, 26, 383-393.
12. Получаване на обогатени фракции на невронални, олигодендроглиал-

ни и микроглиални ядра по методиката на Венков и Величкова (1986). Под печат.

13. Получаване на миелинова фракция по методиката на Venkov и Stoykova (1973). *C. R. Acad. bulg. Sci.*, 28, 837–840.
14. Получаване на пречистена миелинова фракция от централна нервна система по методиката на Norton и Poduslo (1975). *J. Neurochem.*, 21, 749–757.
15. Получаване на капилярна фракция от централна нервна система по методиката на Venkov и Manolova (1980). In: *Synaptic constituents in health and disease*. Mladinske knjiga — Pergamon Press, p. 656.
16. Определяне на белтък по методиката на Lowry et al. (1951). *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275.
17. Определяне на белтък по методиката на Bradford (1976). *Analyt. Biochem.*, 72, 248–254.
18. Пречистване на белтък чрез изсолване и йонообменна хроматография по Weisenberg (1974). *J. Supramol. Struct.*, 2, 451–463.
19. Получаване и пречистване на тубулин по Shelanski et al. (1973). *Proc. Nad. Acad. Sci.*, 70, 765 и Borisy et al. (1975). *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 253, 107.
20. Разделяне на белтъци чрез полиакриламидна гел-електрофореза по методиката на Laemmly (1970). *Nature*, 227, 680.
21. Двумерна електрофореза (изоелектрично фокусиране в едната посока и разделяне по молекулни тегла в другата) по методиката на O'Farrell (1975). *J. Biol. Chem.*, 35, 4007.
22. Тънкослойна хроматография (едномерна, двумерна) върху готови или приготвени плаки.
23. Хартиена хроматография за идентифициране на фосфолипиди по Dawson et al. (1972). *Biochem. J.*, 84, 497.
24. Колонна хроматография — йонообменна, афинитетна, гел-филтрация.
25. Авторадиография на електрофореграми и хроматограми.
26. Денситометрия с преминаваща и отразена светлина, както и на флуоресциращи фракции и количествено определяне на фракции върху денситограми с електронен интегратор и вграден принтер-плотер.
27. Определяне на радиоактивност с помощта на течна сцинтилация.
28. Спектрофотометрия (УВ, ВИЗ, флуоресцентна, определяне на концентрации, ензимна кинетика, взаимодействие между флуоресцентно белязани вещества).
29. Проявяване на ензимни активности върху електрофоретични гелове.
30. Определяне на ацетилхолинестераза по методиката на Ellman et al. (1961). *Biochem. Pharmac.*, 7, 88–95.
31. Определяне на ацетилхолинсинтетаза по методиката на Fonnum (1969). *Biochem. J.*, 113, 291–298.
32. Определяне на лактатдеhidрогеназа по методиката на Emery (1967). *Biochem. J.*, 105, 599.
33. Определяне на натриево-калиево-АТФ-аза по методиката на Hosie (1965). *Biochem. J.*, 96, 404.
34. Определяне на фумараза по методиката на Rucker (1950). *Biochem. Biophys. Acta*, 4, 211.
35. Определяне на гама-аминотрансептидаза по методиката на Dimov, Kulhanek (1967). *Clin. Chim. Acta*, 16, 271–277.
36. Определяне на алкална фосфатаза по методиката на Bessey et al. (1946). *J. Biol. Chem.*, 164, 321–329.
37. Определяне на ДНК зависима ДНК-полимераза по методиката на Chin et al. (1970). *Biochem. Biophys. Acta*, 209, 34–42.
38. Определяне на ДНК-полимераза (алфа- и бета-форми) по методиката на Hübscher et al. (1977). *Nucleic acid Research*, 4, 2917.
39. Определяне на ДНК зависима РНК-полимераза по методиката на Smuckler, Hadjiolov (1972). *Biochem. J.*, 129, 152–166.
40. Количествено определяне на ДНК и РНК в мозък по методиките на Sauten, Agranoff (1963). *Biochem. Biophys. Acta*, 72, 251–262.

41. Определяне на ДНК по Burton (1956).— *Biochem. J.*, **62**, 315–323.
42. Фенолно изолиране на РНК от мозък по методиките на Markov, Arion (1973).—*Europ. J. Biochem.*, **35**, 186–200; Hadjiolov et al. (1974).—*Biochem. J.*, **138**, 321–334.
43. Фракциониране на отделните рНК видове с агар-урейна електрофореза по методиката на Dudov et al. (1976), *Analyt. Biochem.*, **76**, 250–258.
44. Определяне на ацетилхолин с хемилуминесцентна методика по Israel, Lesbats (1981). *Neurochem. Int.*, **3**, 81–90.
45. Определяне на ацетилхолинови рецептори в мозък на плъх по методиката на Yamamura et al. (1974). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1725–1729.
46. Определяне на допаминови рецептори по Burt et al. (1979). *Science*, **206**, 854–856.
47. Определяне на серотонинови рецептори по Peroutka, Snyder (1979). *Molec. Pharmacol.*, **16**, 687–699.
48. Определяне на енкефалинови рецептори по Stengaard-Pedersen, Larsson (1981). *Acta Pharmac. Tox.*, **48**, 39–46.
49. Определяне на бета-адренергични рецептори в мозък по Alexander et al. (1975). *Nature*, **258**, 437–440.
50. Определяне съдържание на норадреналин, допамин и серотонин в мозък на плъх по Jacobowitz, Richardson (1978). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **8**, 515–519.
51. Определяне скорост на обмяна на норадреналин и допамин по Spector (1966). *Pharmacol. Rev.*, **18**, 599–610.
52. Определяне скорост на обмяна на серотонин по Morot-Gaudry et al. (1974). *Arch. Pharmacol.*, **282**, 223–238.
53. Определяне на бета-ендорфин в мозък с радиоимунна методика по Anhut et al. (1981). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **316**, 59–63.
54. Интрацистернално въвеждане на химически вещества по Ueda et al.

- (1983). — *Europ. J. Pharmacol.*, **108**, 314.
55. Извличане на общи липиди от мозък по методиката на Folch, Stanley (1957). — *J. Biol. Chem.*, **226**, 497–509.
56. Извличане на общи липиди от мозък по методиката на Bligh, Dyer (1959).— *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911–917.
57. Определяне на фосфолипиди от мозък по методиката на Bartlett (1959).— *J. Biol. Chem.*, **234**, 466–469.
58. Определяне на холестерол по методиката на Miller et al. (1959). *Clin. Chem.*, **5**, 609–620; Zlatkis, Zak (1969). *Anal. Biochem.*, **29**, 143–148.
59. Определяне на гликолипиди по методиката на Yamamoto, Rouser (1970). *Lipids*, **5**, 442–444; Hamilton et al. (1956). *Anal. Chem.*, **28**, 350–358.
60. Разделяне на основните групи липиди на техните съставни части по методиката на Rouser et al. (1967). *Lipid Chromatographic Analysis*. Vol. 1, New York, Dekker Inc. p. 99–162.
61. Газхроматографски анализ на мастни киселини по Ackman (1980). *Gas-liquid chromatography of fatty acids and esters*. Vol. 2, New York, Pergamon Press, p. 329–375.
62. Газхроматографски анализ на холестерол по методиката на Teng et al. (1973). — *J. Chromatography*, **75**, 107–116.
63. Газхроматографски анализ на гликолипиди по методиката на Ishibe et al. (1979). — *J. Neurochem.*, **32**, 1665–1670.
64. Радиоизотопни методики за анализ на липиди от нервна тъкан чрез прилагане на ¹⁴C-ацетат, ¹⁴C-ацетилкоензим А, ¹⁴C-глицерол, ¹⁴C-палмитилкоензим А, ³²P, ³⁵S и др.
65. Определяне на АСТН чрез радиоимунната методика на Berson, Yalow (1968). — *J. Clin. Invest.*, **47**, 2725.
66. Определяне на вазопресин чрез радиоимунна методика по North et al. (1978). *Endocrinology*, **103**, 1976.
67. Определяне на бета-ендорфин чрез радиоимунна методика по Guillemin et al. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **77**, 361.

68. Определяне на стероидни хормони чрез радиоимунна методика по Abraham et al. (1977). Handbook of radioimmunoassay. New York, Dekker Inc., p. 591.

69. Електронноизчислителни методики, прилагани с помощта на ПК Правец 82:

Построяване на стандартни криви (статистически обработени) и изчисляване на непознати стойности.

Построяване, надписване и разпечатване на графики.

Запис и обработка на данни от дензитограми на едно- и двумерни електрофореграми.

Запис и обработка на спектрофотометрични данни (концентрации, сравнение на спектри, ензимна кинетика).

Редактиране и разпечатване на текст (кирилица и латиница).

Записване, търсене (по 4 параметъра), форматиране и подреждане на библиографски справки.

ПРОБЛЕМ IV:

1. Определяне на свободни катехоламини в урина по методиката на Von Euler et al. (1961). Acta Physiol. Scand., 51, 348; (1959). Acta Physiol. Scand., 45, 122.

2. Определяне на 11-кортикостероиди в урина по методиката на Börner, Stahl (1965). Acta Biol. Med. Ger., 15, 879; Dörner et al. (1966). Steroids, 8, 845.

3. Определяне на 17-хидроксикортикостероиди в урина по Silber, Porter (1954). — J. Biol. Chem., 210, 923.

4. Определяне на холестерол в кръвен серум по методиката на Watson (1960). Clin. Chim. Acta, 5, 637; Homakova, Cromy (1973). Biochem. Ckin. bochemoslov., 3, 27.

5. Определяне на триглицериди в кръвен серум по методиката на Fletcher (1968). Clin. Chim. Acta, 22, 393; Foster, Dunn (1973). Clin. Chem., 19, 338.

ПРОБЛЕМ V:

1. Определяне на хемоглобин (1967). Inter. Comm. Stand. and haematology. — Brit. J. Haematol., 13 suppl., p. 71.

2. Определяне количеството на еритроцити и левкоцити (камерно или автоматично броене).

3. Измерване утаяването на еритроцитите — Westergren (1957). Triangel., 3, 30

4. Определяне на хематокрит по Каракашов и др. (1959). Sem. Hop., Paris, 35, 92

5. Определяне среден обем на еритроцита (камерно или автоматично).

6. Определяне на глюкоза по методиката на Trinder (1969). Ann. Clin. Biochem., 6, 24

7. Определяне на натрий, калий и хлор (с пламъков фотометър или селективни електроди).

8. Определяне на общ белтък в кръвна плазма по Gornall et al. (1949). — J. Biol. Chem., 177, 751,

9. Определяне на фибриноген по Paar (1971). Blut, 23, 1.

10. Определяне на имуноглобулини (IgГ, IgА, IgМ) с помощта на имуно-дифузия по Mancini et al. (1965). Immunochemistry, 2, 235.

11. Определяне на протеиназни инхибитори (A₂макроглобулин и A₁антитрипсин) чрез имуноелектрофореза „рокет“ по Laurell (1965). — Anal. J. Biochem., 15, 45.

12. Определяне броя на тромбоцити (камерно или автоматично).

13. Агрегация на тромбоцити (спонтанна и стимулирана) по Feinman et al. (1977). — J. Lab. Clin. Med., 90, 125-129.

14. Тромбоцитна секреция (спонтанна и стимулирана), определена с луциферин-луциферазна ензимна система.

15. Еурглобулинов тест по Johnson et al. (1964). Estimation of fibrinolitic

ic activity by whole blood euglobulin clot lysis. p. 465.

16. Определяне на общ холестерол по Siedel et al. (1981).—J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 19, 838.
17. Определяне на триглицериди по Wahlefeld (1974). In: Bergmeyer methods of enzymologic analysis, p. 18—31.
18. Определяне на холестерол в ЛВП по Lones, Fetal (1977). Clin. Chem., 23, 882.
19. Определяне на холестерол в липопротеини.
20. Хиломикронен тест за показател на липопротеиновата обмяна.
21. Определяне на гама-глутамилтрансфераза по Persjin et al. (1976).—J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 14, 421.
22. Определяне на глутаматдехидрогеназа с УВ тест.
23. Определяне на аминотрансферази, аланин и аспартат по Bergmeyer (1980). Clin. Chim. Acta, 105, 147.
24. Определяне на алкохол в кръв по Rücher, Redetzki (1951). Klin. Wschr., 29, 615.

ПРОБЛЕМ VI:

1. Определяне на лактат по методиката на Hohorst (1962). In: Methoden der enzymatischen analyse. Verlag Chemie, p. 266.
2. Определяне на глюкоза по методиката на Schmidt (1961). Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander. Klin. Wschr., 39, 1244—1247.
3. Определяне параметри на алкално-киселинното равновесие на кръвта по Siggaard-Andersen et al. (1960).—Scand. J. Clin. Lab. Invest., 12, 172—176.
4. Определяне на креатинфосфокиназа по методиката на Rosalki (1967).—J. Lab. Clin. Med., 69, 696—705.
5. Определяне на лактатдехидрогеназа по методиката на Amador et al.

(1974). In: Clinical chemistry, Harper Row Pbl., NY, p. 824.

6. Определяне на ACTX по Gambert et al. (1981). Proc. Soc. Exp. Med., 168, 1—4; Fehm et al. (1972). Horm. Metab. Res., 4, 477—481.
7. Определяне на кортизол по Edwards, Landon (1976). In: Hormone assay and their clinical application, Edinburg, p. 519; Rollieri et al. (1976). Clin. Chim. Acta, 66, 319—330.
8. Определяне на соматотропин по Andler et al. (1976). Acta Endocrinol., 80, 70—80.
9. Определяне на лутропин по Migley (1966). Endocrinology, 79, 10—18.
10. Определяне на фолитропин по Rosemberg (1979).—J. Clin. Endocrinol. Metab., 48, 163—166.
11. Определяне на тестостерон по Furuyama et al. (1972). Steroids, 16, 415; Nieschlag (1975). In: Methoden der Hormon bestimmung, p. 285—292.
12. Определяне на бета-ендорфин по Carr et al. (1981).—N. Engl. J. Med., 305, 560—563.
13. Определяне на субстанция P по Leeman (1976). Life Sci., 2033—2044; Eckstein et al. (1980). Neuroendocrinology, 31, 338—342.
14. Определяне на тиротропин по Ellis, Ekins (1973).—J. Endocrinology, 59, p. XLiii.
15. Определяне на инсулин по Biro, Weinges (1973). Med. Lab. (Stuttg), 26, 182—192; Herbert et al. (1965).—J. Clin. Endocrinology, 25, 1375—1384.

НАУЧНОИНФОРМАЦИОННИ ОБЗОРИ

**ПРОГРАМА ЗА КОМПЛЕКСНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЧОВЕКА
И НЕГОВИЯ МОЗЪК**

Стилов редактор Б. Китанова
Технически редактор Г. Льовина
Коректор З. Татеосян

Подписана за печат на 18.11.1987 г.
Поръчка № 257, тираж 200, формат 60/х90/16
Печатни коли 3

МА — Център за научна информация по медицина
и здравеопазване
1431 София, ул. „Г.Софийски“ № 1, тел. 45-70-19

Печатна база при ОТЛС — МА