

УДК 612.821.7;612.82;577.1

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР НЕРВНОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ ЛИШЕНИИ СНА (О НЕЙРОХИМИЧЕСКИХ ПРИЧИНАХ НЕОБХОДИМОСТИ СНА У ВЫСШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ)

ДЕМИН Н. Н.

Изложены результаты определений в различных отделах и субцеллюлярных фракциях головного мозга крыс с нарушениями сна: содержания «свободных» SH-групп, дыхания синапсом при инкубации их в средах разного ионного состава, связывания рутеневого красного синапсом, выхода кислой РНКазы и катепсина D из лизосом. На основе полученных данных сделано заключение, что одной из основных метаболических нейрохимических причин периодически возникающей необходимости сна высших позвоночных может быть постепенно развивающаяся альтерация мембранных структур нервной ткани, по-разному проявляющаяся в различных отделах головного мозга.

При сне млекопитающих в головном мозгу протекают весьма активные физиологические процессы. В настоящее время прежде всего на основе биоэлектрических явлений был выделен ряд закономерно чередующихся четко характеризующихся фаз и стадий полноценного сна. Много уже известно и об участии при этом главных медиаторов. В то же время только еще начинают развиваться исследования фундаментальных нейрохимических коррелятов динамики процессов засыпания, различных фаз и стадий сна, последующего пробуждения [1—8]. Две основные фазы сна значительно отличаются друг от друга: начальная—медленноволновая фаза сна (МФС)—характеризуется синхронизированными высоковольтными медленными биоэлектрическими колебаниями в коре больших полушарий головного мозга; развивающаяся только после МФС более глубокая парадоксальная фаза сна (ПФС) характеризуется биоэлектрическими явлениями, близкими к наблюдаемым при бодрствовании,—десинхронизированными низковольтными быстрыми волнами. Обнаруживаются и нейрохимические различия между МФС и ПФС. Примечательно, что доля ПФС от общей суточной продолжительности эпизодов сна наиболее высока у человека; в то же время выясняется, что для репаративных биохимических процессов нейроны нуждаются именно в ПФС [8], поэтому она и привлекает большое внимание. При изучении биологической роли ПФС распространенным методическим приемом является исследование результатов ее искусственного лишения—селективной бессонни-

ды. Бессонницу вообще можно рассматривать в известной мере как модель затянувшегося бодрствования с экстраполяцией тех сдвигов, которые могут при нем постепенно накапливаться, вызывая настоятельную потребность в сне. По такому пути развивается и ряд исследований в нашей лаборатории, имеющих целью выявление нейрохимических компонентов причины необходимости сна [8, 9]. При этом вызывают интерес биохимические изменения именно в определенных субцеллюлярных мембранных структурах разных морфологических образований в головном мозгу. Некоторые итоги этих исследований изложены в данном сообщении.

Материалы и методы

Опыты всех серий были проведены на белых крысах линии Вистар обоего пола массой 170—200 г. Животных доставляли в лабораторию за сутки до опыта и размещали в отдельных клетках. Лишение ПФС вызывали по принципу метода Jouvet и соавт. [10]. Для этого крыс помещали на площадки размером 45×45 мм, расположенные на 1—2 мм над водой в соответствующем бассейне. В этих условиях у крыс могла развиваться МФС, но в результате характерного для ПФС резкого падения тонуса мышц шеи при переходе МФС в ПФС голова крысы опускалась в воду и животное немедленно просыпалось. Проведенная нами [11] специальная экспериментальная проверка подтвердила достаточную адекватность такого метода селективного лишения ПФС для нейрохимических исследований [8]. Подопытных крыс умерщвляли быстрым декапитированием через различные сроки после помещения их на маленькие площадки. Одновременно с подопытными забивали контрольных животных, находившихся в это время в обычных клетках в состоянии спокойного бодрствования.

В различных препаратах, полученных из разных отделов головного мозга, производили ряд биохимических исследований. В разных сериях опытов по методикам, детально описанным в цитируемых статьях, определяли содержание SH-группы [12], активность кислой РНК-азы [13], потребление O_2 [14] и связывание красителя [15].

Результаты и обсуждение

Такие весьма реактивные функциональные группы, как сульфгидрильные, имеют большое биологическое значение. Эти группы, входящие в состав белковых молекул, играют первостепенную роль для их конформации, а тем самым для свойств мембран, в которые входят подобные белки, для активности многих ферментов и т. д. Исходя из этого, Рашевской в серии опытов [12] при помощи амперометрического титрования $AgNO_3$ были произведены определения содержания SH-группы в различных препаратах головного мозга крыс, подвергнутых лишению ПФС до 96 ч. Было установлено, что в условиях наших опытов лишение крыс ПФС (в течение 24, 48 и 96 ч) не сопровожда-

лось какими-либо сдвигами содержания титруемых («свободных») SH-групп в гомогенатах лобной и затылочной областей коры больших полушарий, в гомогенатах варолиева моста с продолговатым мозгом и мозжечка. В гомогенатах среднего мозга и переднего отдела промежуточного мозга животных, подвергнутых 24-часовому лишению ПФС, было выявлено значительное повышение содержания SH-групп в среднем соответственно на 23 и 24% по сравнению с контрольными крысами. Спустя 48 ч после начала опыта отклонение от контроля достигало в среднем 28% в обоих отделах. Повышенное количество SH-групп приблизительно на том же уровне (26 и 24%) можно было констатировать и при 96-часовом лишении ПФС.

В то же время каких-либо изменений содержания SH-групп в течение лишения ПФС до 96 ч во фракциях растворимых белков всех исследованных отделов головного мозга найдено не было. Не наблюдалось изменения количества в них также и низкомолекулярных тиоловых соединений.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что лишение ПФС, во-первых, избирательно влияет на содержание SH-групп в различных отделах головного мозга—только в передней части его ствола (из исследованных отделов), а во-вторых, изменения проявляются лишь в случае нерастворимых, структурных белков. Далее было установлено, что содержание -S-S-групп при этом в тех же объектах не менялось. Следовательно, увеличение количества SH-групп являлось результатом не восстановления -S-S-групп, а «высвобождения» преформированных SH-групп, что свидетельствует о какой-то альтерации структурных белков части ствола головного мозга в сторону их депатурации, наступающей при нарушении сна. Как показали дальнейшие исследования [16], это повышение содержания SH-групп оказалось весьма стойким—при возвращении крыс в условия их обычного пребывания после 24-часового лишения ПФС полная нормализация количества SH-групп в гомогенатах ствола головного мозга наступала лишь спустя 36 ч. Некоторые другие, еще более выраженные сдвиги, в аналогичных условиях исчезали уже в пределах 1 ч [8].

В каких же субцеллюлярных структурах могли иметь место описанные сдвиги содержания SH-групп при лишении ПФС? В связи с этим были исследованы полученные дифференциальным центрифугированием обогащенные ядерная и синаптосомная фракции, а также относительно чистые препараты митохондриальной фракции, а также от мозга крыс, подвергнутых 24-часовому лишению ПФС [12]. Как видно и в случае суммарного гомогената), сопровождавшие лишение ПФС, же уровень SH-групп не отличался от контрольных величин. Можно было заключить, что альтерация соответствующих нерастворимых белков при нарушении сна протекает в мембранах ядер и синаптического ап-

парата, но не в митохондриях. Следует заметить, что такое частичное развертывание пептидных цепей белков этих мембранных структур может повышать их атакуемость пептидгидролазами и способствовать разрушению мембран со снижением содержания белков [8].

Изменения биологических свойств синаптических структур в результате лишения ПФС были отчетливо продемонстрированы и в серии работ Ниловой [14, 17], в которых было изучено потребление O_2 инкубированными в средах различного ионного состава синаптосомами больших полушарий и ствола головного мозга крыс, подвергнутых 24-часовому лишению ПФС. Было показано [14] (рис. 2, а), что снижение концентрации Na^+ в среде инкубации синаптосом больших полушарий со 124 до 7,5 мМ лишь недостоверно снижало их дыхание (на глутамине). При добавлении в такую среду 0,15 мМ Ca^{2+} торможение дыхания становилось достоверным. Если же синаптосомы были выделены из гомогената больших полушарий после 24-часового лишения ПФС, то уже сама пониженная концентрация Na^+ вызывала падение дыхания, но при этом без дополнительного его уменьшения при добавлении Ca^{2+} . Это явление оказалось еще более выраженным при исследовании дыхания синаптосом ствольной части головного мозга (рис. 2, б).

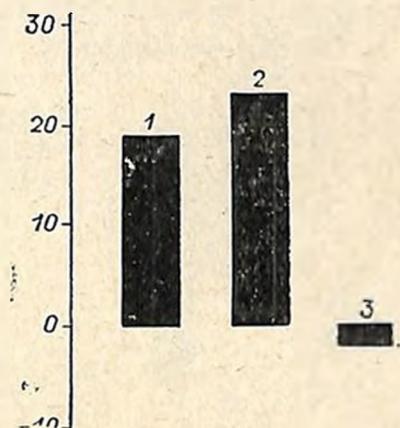


Рис. 1. Содержание SH-групп в субцеллюлярных фракциях гомогената ствола головного мозга крыс после 24-часового лишения парадоксальной фазы сна (ПФС): 1—синаптосомная фракция, 2—ядерная, 3—митохондрии. По оси ординат—отклонения от величины при бодрствовании в %

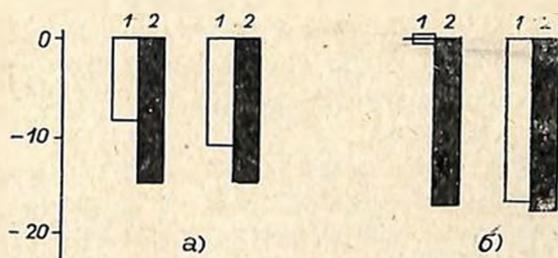


Рис. 2. Потребление O_2 синаптосомами, полученными из гомогенатов больших полушарий (а) и ствола (б) головного мозга крыс после 24-часового лишения ПФС: 1—после 30-минутной инкубации в среде с 7,5 мМ Na^+ , 2—то же с 7,5 мМ Na^+ и 0,15 мМ Ca^{2+} ; белые столбики—синаптосомы бодрствовавших животных, черные—синаптосомы животных, лишенных ПФС. По оси ординат—отклонения от величины при бодрствовании в %

Далее Ниловой [17] был выявлен эффект лишения ПФС также и на дыхании синаптосом при деполяризации мембран под влиянием вы-

сокого содержания K^+ в инкубационной среде. Так, потребление O_2 синапсосами бодрствовавших крыс повышалось в среде с увеличенным содержанием K^+ , а добавление Ca^{2+} снимало этот эффект. В случае же синапсосов крыс, подвергнутых 24-часовому лишению ПФС, повышение содержания K^+ вызывало гораздо меньшее действие на дыхание, а добавление Ca^{2+} оказывалось неэффективным.

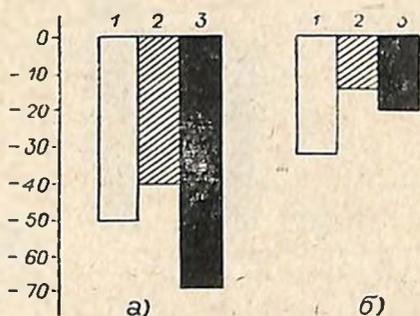


Рис. 3. Связывание рутениевого красителя синапсосами, полученными из коры больших полушарий (а) и ствола (б) головного мозга крыс после 24-часового лишения ПФС, по количеству связанного красителя в Мг белка: 1—после 1-часовой инкубации с красителем синапсосом крыс, лишенных ПФС, 2—после инкубации с красителем и 0,5 мМ Ca^{2+} синапсосом бодрствовавших животных, 3—после инкубации с красителем и 0,5 мМ Ca^{2+} синапсосом крыс, лишенных ПФС. По оси ординат отклонения от величины при бодрствовании в %

При этом эффект лишения ПФС оказался близким к действию Ca^{2+} ; возможно, что в основе влияния нарушения сна в этом отношении лежит и избыточное выделение Ca^{2+} в синапсах в таких условиях.

Наше внимание привлекали и такие клеточные мембранные структуры нервной ткани, как лизосомы. Объектом исследований Нечаевой и Шелешинной [13] послужили обогащенные лизосомные фракции, которые выделяли из гомогенатов коры больших полушарий и из ствола головного мозга крыс после 6-, 24-, 48- или 96-часового лишения ПФС, а также полной бессонницы. При сравнении с препаратами, полученными у контрольных животных, был изучен спонтанный и стимулируемый гистонами (фракция f_{21} из зобной железы телят) выход из лизосомной кислоты РНКазы и катепсина D при 30-минутной инкубации при 23° (в 0,25 М сахарозе с 0,01 М трис-буфером, pH 7,4). Активность кислотной РНКазы определяли на препаратах полимерной РНК, полученных из коммерческой дрожжевой РНК, с ацетатным буфером, pH 5,8. Актив-

Лишение ПФС приводило и к изменениям тинкториальных свойств синапсосных мембран. Как было показано [15], синапсосы больших полушарий и стволовой части головного мозга крыс, лишенных ПФС в течение 24 ч, связывали меньше основного красителя—рутениевого красителя, чем синапсосы бодрствовавших животных (рис. 3). Так, в синапсосах больших полушарий число мест связывания красителя понижалось на 51%, а в выделенных из ствола—на 31%; в то же время это имело место на фоне увеличения сродства к красителю. Снижение связывания рутениевого красителя синапсосами вызывало также и добавление Ca^{2+} ; в случае же крыс, лишенных ПФС, эффект Ca^{2+} был ниже.

Можно заключить, что нарушение сна способно вызывать изменения синапсосных мембран с нарушением их нормальной проницаемости.

ность катепсина D находили при pH 3,8 с денатурированным 1%-ным гемоглобином.

Полученные данные показали, что спонтанное высвобождение гидролаз из лизосом в течение 30-минутной инкубации обогащенной этими субцеллюлярными частицами фракции составляло в среднем около 5% от общей активности этих ферментов в гомогенатах как больших полушарий, так и стволовой части головного мозга крыс, находившихся в состоянии бодрствования. Не было существенных отклонений от этих контрольных данных и в случае инкубации препаратов, полученных из ствола головного мозга животных, которые были лишены ПФС до 96 ч; не было сдвигов и в размере выхода катепсина D в тех же условиях из препаратов больших полушарий и ствола.

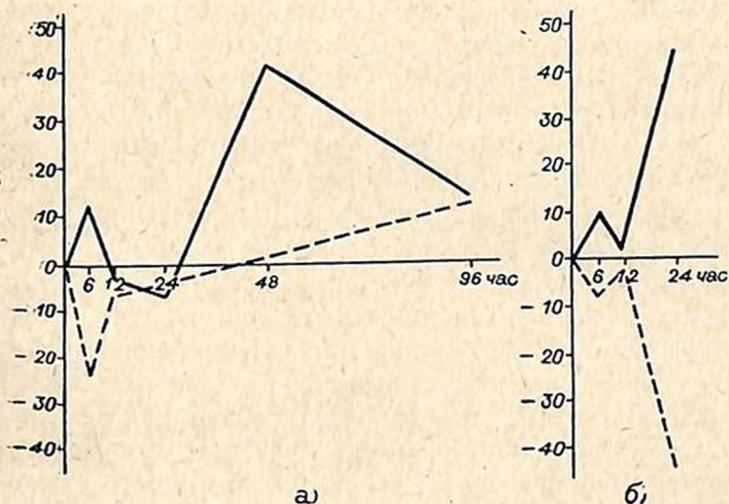


Рис. 4. Выход кислой РНКазы из лизосом проб, полученных из коры больших полушарий крыс при нарушениях сна: а—при лишении ПФС, б—при полной бессоннице; сплошная линия—спонтанный выход фермента, пунктирная—выход фермента при добавлении гистона. По оси абсцисс— время в ч; по оси ординат—отклонения от величины при бодрствовании в %

Другие данные были получены при изучении спонтанного выхода кислой РНКазы из лизосом клеток больших полушарий в те же сроки лишения ПФС. На рис. 4, а видно, что динамика высвобождения этого фермента имела фазный характер: выход его из лизосом после 6-часового лишения ПФС и весьма резко после 48-часового значительно превышал контрольные данные. В случае полного лишения сна (рис. 4, б) выраженный пик выхода кислой РНКазы был отмечен через 24 ч лишения сна

Ранее было установлено [18], что добавление гистона i_{2n} примерно в 3 раза повышает выход кислой РНКазы из лизосом. В то же время на рис. 3, а видно, что в пробах после 6-часового лишения ПФС стимулируемый гистонами выход фермента оказался ниже, чем в про-

бах, полученных у бодрствовавших крыс. Такую ренипрокность с картиной спонтанного выхода кислой РНКазы наблюдали в более выраженной степени в препаратах больших полушарий крыс, испытавших полную бессонницу (рис. 3, б): увеличение спонтанного выхода фермента на 45% по сравнению с контролем при падении стимулируемого гистонем выхода на 49%.

Можно заключить, что нарушения сна могут приводить в головном мозгу к избирательным изменениям свойств и таких мембранных структур, как лизосомы, причем лишь в определенных отделах мозга.

Итак, нарушения сна (лишение ПФС, полная бессонница) могут приводить к сдвигам денатурационного характера содержания SH-группы в нерастворимых (мембранных) ядерных и синапсомных белках, изменениям проницаемости синапсомных мембран со сдвигами их реакции на Ca^{2+} , — уменьшению сорбции красителя этими мембранами и фазным сдвигам свойств лизосомных мембран. При этом обращает на себя внимание и специфичность этих явлений лишь для определенных отделов головного мозга. В общем можно высказать рабочую гипотезу о том, что разнообразные сдвиги свойств именно мембранных структур ряда отделов головного мозга, постепенно накапливаются при бодрствовании, могут быть одним из важнейших компонентов того комплекса факторов, который и вызывает метаболическую необходимость периодического сна высших позвоночных животных и человека — активного состояния головного мозга на фоне выраженной деафферентации [8, 9]. Эти сдвиги и должны закономерно устраняться в течение различных фаз сна; в противном же случае развиваются более или менее тяжелые невропатологические последствия бессонницы. Определенные формы покоя (П-1 и П-2) низших позвоночных — обездвиживания, отличные от полноценного сна высших (с экологическим причинам [19] и не сопровождаются определенными анаболическими процессами, характерными для настоящего сна [20].

Можно предположить, что альтерационно-денатурационные изменения белков мембран нервной ткани вместе с повышением активности пептидгидролаз (при усилении катаболизма белков) [8] приводят к появлению каких-то свободных пептидов, служащих непосредственными триггерами включения нейрохимических основ динамики сна. Одним из таких уже выявленных пептидов является дельта-гипногенный пептид Моннье, хотя сам по себе он способен вызывать лишь дельта-стадию МФС, не сопровождающуюся анаболическими процессами, и препятствует развитию ПФС [21]. Поиски других гипногенных пептидов, несомненно, перспективны.

BIOCHEMICAL CHANGES IN MEMBRANE STRUCTURE OF RAT
NERVOUS TISSUE UNDER SLEEP DEPRIVATION
(ON NEUROCHEMICAL CAUSES OF SLEEP NECESSITY
IN HIGHER VERTEBRATES)

DOEMIN N. N.

Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

„Free“ (exposed) SH-group content, respiration of synaptosomes upon incubation in media with various ion composition, the ruthenium red binding to synaptosomes and release of acid RNA-ase and cathepsin D from lysosomes have been studied in brain various parts and subcellular fractions of rat subjected to sleep disturbances.

Data obtained point to the conclusion, that gradually developing during waking state biochemical alteration of brain various parts membranes (in particular, changes of some membrane proteins stability against denaturation) may serve as one of the main neurochemical causes of periodically arising sleep necessity in higher vertebrates.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Jouvot M. *Physiol. Rev.*, 47, 117—177, 1967.
2. Вейн А. М. Бодрствование и сон, М., Наука, 126 с., 1970.
3. Moruzzi G. *Erg. d. Physiol.*, 64, 1—165, 1972.
4. Jouvot M. *Erg. d. Physiol.*, 64, 166—307, 1972.
5. Koella W. P. *Die Physiologie des Schlafes*, Stuttgart, 202 s, 1973.
6. Giuditta A.—In: *Biochemical correlates of brain structure and function* (ed A. N. Davison), L., 293—337, 1977.
7. Karnovsky M. L., Reich P.—In: *Adv. in Neurochemistry* (eds. B. W. Agranoff, M. H. Aprison) 2, N. Y., 213—275, 1977.
8. Демин Н. Н., Коган А. Б., Мусеева Н. И. *Нейрофизиология и нейрохимия сна*, Л., Наука, 189 с., 1978.
9. Демин Н. Н.—В кн.: *Цитохимические корреляты торможения нейронов* (под ред. Л. З. Певзнера), Л., Наука, с. 18—39, 1978.
10. Jouvot D., Vimont P., Delorme F., Jouvot M., *C. R. Soc. Biol.*, 158, 4, 756—759, 1964.
11. Демин Н. Н.—В сб.: *Вопросы биохимии нервов и мышечн. систем* (под ред. В. И. Чиквандзе), Тбилиси, 3, с. 155—160, 1979.
12. Демин Н. Н., Раишевская Д. А. *Физиол. ж. СССР*, 65, 23—28, 1979.
13. Демин Н. Н., Нечаева Г. А., Шелепина Е. П. *Физиол. ж. СССР*, 63, 1073—1078, 1977.
14. Нилова Н. С. *Физиол. ж. СССР*, 65, 352—356, 1979.
15. Нилова Н. С. *Цитология*, 22, 1081—1084, 1980.
16. Раишевская Д. А. *Физиол. ж. СССР*, 66, 313—317, 1980.
17. Нилова Н. С. *Физиол. ж. СССР*, 67, 1324—1328, 1981.
18. Нечаева Г. А., Демин Н. Н., Ашмарин П. П. *ДАН СССР*, 202, 232—235, 1972.
19. Карманова И. Г. *Эволюция сна*, Л., Наука, 174 с., 1977.
20. Демин Н. Н., Карманова И. Г.—В кн.: *Сон как фактор регуляции функционального состояния организма*, Каунас, 1982.
21. Демин Н. Н., Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Рубинская Н. Л. *Ж. эвол. биох. и физиол.*, 16, 257—260, 1980.

Институт физиологии
им. Павлова АН СССР, Ленинград

Поступила 16. XI 1981