

УДК 547.962:547.963.3:576.3:591.481.1

БЕЛКИ И РНК В НЕЙРОНАХ И ГЛИОЦИТАХ СУПРАОПТИЧЕСКОГО ЯДРА ПРИ ЛИШЕНИИ СНА

ПАНОВ А. Н., КРИВЕНКО Н. Е.

Исследовали метаболический ответ нейронов и их глиальных клеток-сателлитов супраоптического ядра гипоталамуса крысы на лишение сна в медленно вращающемся цилиндре третбана.

Через 24 ч лишения сна объем нейронов и глиоцитов возрастал (на 56 и 23% соответственно), а через 48 ч объем нейронов не отличался от контрольных величин, тогда как объем глиоцитов оставался повышенным (на 15%). Концентрация РНК в клетках не менялась во все сроки исследования, а концентрация белков была снижена через 24 ч (на 20 и 17% в нейронах и глиоцитах соответственно). В расчете на 1 клетку содержание определяемых веществ в нейронах было увеличено только через 24 ч лишения сна (на 53 и 25% для РНК и белков соответственно); в глиоцитах повышение было отмечено лишь в отношении белков и только через 48 ч бессонницы. Выявлено сходство реагирования супраоптического ядра на лишение сна в третбане с ответом клеток дорзального ядра шва в этих же условиях.

Нарушения цикла бодрствование—сон, в частности селективное лишение парадоксальной фазы сна (ПФС), приводят к различным изменениям метаболических процессов, выявляемых как на уровне всего организма, так и отдельных его органов, особенно в головном мозгу [1—3]. В то же время функциональная специфичность отдельных структур головного мозга и составляющих их клеток требует использования специальных методических приемов, позволяющих анализировать отдельные морфологические структуры, а в них определять биохимические компоненты раздельно в нейронах и глиоцитах. В этом плане наиболее адекватными являются методы цитохимии.

Одним из первых при лишении ПФС цитохимическому исследованию было подвергнуто нейросекреторное супраоптическое ядро (СОЯ) гипоталамуса крысы [4—6]. Оно было избрано, прежде всего, вследствие интенсивного метаболизма белков и РНК в нем. Выявленные фазные изменения содержания этих компонентов показали наличие как сходства, так и различия в метаболическом ответе нейронов и прилегающих к ним глиальных клеток-сателлитов на лишение ПФС.

Было установлено [7—9], что полное лишение сна (ПЛС) при вращении крыс в цилиндре третбана вызывало в клетках ядер стволовой части мозга сдвиги в содержании белков и РНК, направленность которых оказалась противоположной изменениям, обнаруженным в них при селективном лишении ПФС.

В задачу настоящего исследования входило определение метаболического ответа—изменений концентрации и содержания (в расчете на 1 клетку) белков и РНК в нейронах и глиоцитах СОЯ гипоталамуса при ПЛС.

Материалы и методы

Опыты были поставлены на крысах-самцах линии Вистар массой 180—220 г. Животных помещали попарно в отсеки цилиндрического третбана (диаметр—50 см, скорость вращения—2,3 об/мин). Поперечные перекладки внутри цилиндра препятствовали пассивному перекачиванию крыс [10]. В третбане были подвешены поилки и заложен сухой корм. Каждые 12 ч животных на 20—30 мин отсаживали в обычные клетки и давали им мягкий корм. Через 24 или 48 ч после начала опыта крыс декапитировали, головной мозг выделяли, его ствольную часть фиксировали в реактиве Бродского, обезвоживали, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 6—8 мкм. После депарафинирования срезы окрашивали на нуклеиновые кислоты галлоцианин-хромовыми красками [11], а на общие белки—амидочерным 10 Б [12].

Оптическую плотность клеток измеряли на двухлучевом микрофотомере МУФ-5 при 595 и 620 нм для нуклеиновых кислот и белков соответственно. Выбирали нейроны, на срезах которых ясно различалось ядрышко. Размер зонда был подобран таким образом, чтобы исследовать отдельные участки цитоплазмы нейрона, тело же глиоцита было меньше величины зонда.

Таким образом, в нейронах определяли цитоплазматическую РНК и белки, а в глиоцитах—суммарные белки ядра и цитоплазмы и сумму РНК и ДНК. Так как содержание ДНК в клетках мозга постоянно, все изменения можно было относить на счет лишь РНК (для удобства в дальнейшем речь будет идти только об РНК).

Размеры клеток измеряли окуляр-микрометром; для вычисления объема использовали формулу эллипсоида вращения. В телах нейронов определяли объем цитоплазмы, у глиоцитов—объем всей клетки. Так как оптическая плотность пропорциональна молекулярной концентрации, то зная ее величину и объем клетки, можно рассчитывать содержание РНК и белков в 1 клетке (в усл. ед.). Детальное описание обработки ткани и ее анализа дано ранее [13]. Каждая группа содержала 5—6 животных, в каждом СОЯ было исследовано 20—25 клеток. СОЯ идентифицировали по атласу Wünscher и соавт. [14]. Во всех опытах забивали равное количество подопытных и контрольных крыс; ткани обеих групп обрабатывали одновременно. Наблюдаемые изменения выражали в процентах от величин, установленных для животных, содержащихся в обычных клетках.

Результаты обрабатывали по тесту Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Изменения объемов цитоплазмы нейронов и тел глиоцитов, концентрации РНК и белков и содержания (в 1 клетке) этих веществ через 24 и 48 ч ПЛС представлены на рисунке.

Было установлено, что через 24 ч нахождения животных в третбане объем цитоплазмы нейронов увеличивался на 56, а глиальных клеток-сателлитов—на 23%. Однако через 48 ч ПЛС объем нейронов не отличался от контрольного уровня, тогда как объем глиоцитов, хотя и несколько уменьшался, но все еще превышал уровень контроля на 15%.

Исследование обоих типов клеток, окрашенных на нуклеиновые кислоты, не выявило каких-либо изменений их оптической плотности, а следовательно, и концентрации изучаемых компонентов в течение всего опыта. Содержание РНК в цитоплазме нейронов резко возросло в 1-е сутки опыта (на 53%), но на 2-е сутки оно не отличалось достоверно от контроля. В глиоцитах повышения содержания РНК не было обнаружено: сдвиги на 9 и 12% через 24 и 48 ч оказались недостоверными.

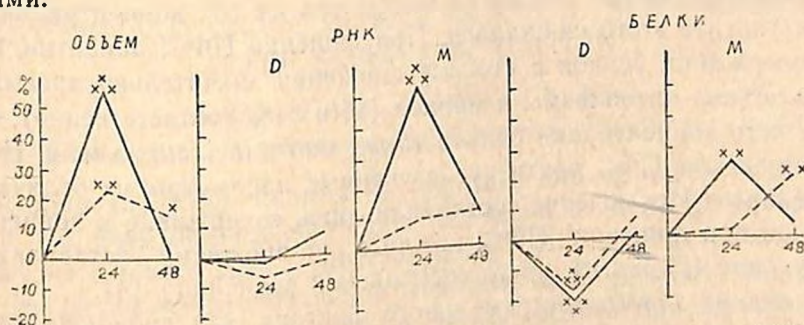


Рис. Изменения объемов нейронов и глиоцитов, концентрации и содержания РНК и белков в них при полном лишении крыс сна в цилиндре вращения при ПЛС (в % к соответствующим величинам у контрольных животных). По оси абсцисс—продолжительность лишения сна в ч, по оси ординат—отклонения в %. Условные обозначения: D—оптическая плотность, M—содержание в расчете на 1 клетку; сплошная линия—нейроны, пунктирная—глиоциты; * $p < 0,02$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Динамика изменений содержания белков в нейронах и глиоцитах СОЯ при ПЛС была близкой к изменениям содержания РНК. Так, количество белков в цитоплазме нейронов было увеличено через 24 ч на 25%, а через 48 ч этот показатель полностью нормализовался. В то же время отсутствие изменений в глиоцитах в 1-е сутки опыта сменялось на значительное увеличение содержания белков в них через 2 суток бессонницы (на 21%). Концентрация белков снижалась в нейронах и глиоцитах (на 20 и 17% соответственно) через 24 ч ПЛС, а затем повышалась до контрольного уровня.

Участие гипоталамических ядер, в том числе СОЯ, в организации циркадных ритмов и связанной с ними периодической бодрствования—сон [15] может быть основой значительных метаболических сдвигов в клетках этого образования при нарушениях сна. Ранее было пока-

зано [5, 6], что избирательное лишение крыс ПФС приводило к значительному снижению содержания РНК, и особенно белков в СОЯ в 1-е сутки опыта (на 36 и 45% соответственно), причем, хотя на 2-е сутки амплитуда этих отклонений и уменьшалась, уровень содержания компонентов все же оставался пониженным (на 13 и 22% для РНК и белков соответственно). Уменьшение объемов нейронов (на 34%) способствовало поддержанию достаточно стабильной концентрации РНК в них, но концентрация белка была снижена (на 16 и 18% через 24 и 48 ч лишения ПФС соответственно) [4].

Таким образом, в 1-е сутки нарушения сна имело место определенное сходство в реагировании нейронов СОЯ на избирательное лишение ПФС и на ПЛС: концентрация РНК не менялась, а белков снижалась, но достигался этот эффект различными путями. При ПЛС значительно (в 1,5 раза) возрастало содержание РНК в клетке, при этом соответственно увеличивался и объем цитоплазмы нейронов. При лишении же одной ПФС содержание снижалось на 1/3 и на столько же уменьшался объем. Содержание белков в нейронах при ПЛС увеличивалось всего на 1/4, тогда как объем возрастал более, чем на 1/2; концентрация белков в результате этого снижалась. При лишении ПФС, напротив, изменение содержания белков в сторону снижения значительно превышало сдвиги в объеме цитоплазмы нейронов (45 и 34% соответственно), в результате чего концентрация белков также оказалась сниженной. На 2-е сутки нарушения ПФС почти все изученные параметры не отличались от нормальных. Исключение составляли лишь содержание и концентрация белков при лишении ПФС, которые по-прежнему оставались на низком уровне (22 и 18% ниже контрольной величины) [4].

В условиях такого экстремального фактора, как продолжительное ПЛС в третбане, метаболический ответ нейроглиальных клеток был, как правило, менее выражен, чем реакция нейронов, особенно в 1-е сутки депривации. Это соответствует картине, характерной для нейроглиальных взаимоотношений при действии и других экстремальных факторов [16].

Противоположная направленность изменений объемов нейронов и содержания в них РНК и белков при двух формах бессонницы была отмечена и при исследовании таких образований ЦНС, как ядра шва и синее пятно (СП) [7—9]. При этом характер ответа СОЯ на лишение сна оказался более сходным с ответом дорзального ядра шва (ДЯШ), которое, по нашему мнению, в большей степени связано с процессом организации сна, чем СП и ядро шва моста (ЯШМ). Действительно, при лишении ПФС содержание РНК и белков в нейронах ДЯШ было снижено в оба срока исследования (24 и 48 ч), тогда, как в ЯШМ и СП эти показатели на 2-е сутки опыта нормализовались. Еще большее сходство было выявлено при ПЛС: в этих условиях, вслед за повышением содержания РНК и белков в 1-е сутки, на 2-е сутки имели место изменения в противоположном направлении, приводившие к нормализации количества РНК и белков в СОЯ и РНК—в ДЯШ, с уменьшением содержания белков в последнем. В то же время в нейронах двух других

ядер содержание РНК и белков на 2-е сутки было увеличено по сравнению с контролем.

Казалось бы, что ПЛС является более сильным воздействием, чем лишение только одной фазы сна. Однако полученные результаты свидетельствуют о том, что нарушение нормальной структуры сна, видимо, вызывает большие метаболические сдвиги, чем полная бессонница. Подтверждается мнение об особой, специфической роли ПФС в восстановительных функциях сна [17, 18]. С другой стороны, организм может реагировать и на использованную нами методику для ПЛС—нахождение животных в непрерывно вращающемся цилиндре третбана.

Возможно, что непосредственной причиной установленных сдвигов является не только полная бессонница, но и указанное вынужденное многочасовое движение, осуществление которого обеспечивается активацией ряда систем ЦНС, в том числе и СОЯ. Для решения этой проблемы требуется разработка новых методических приемов, позволяющих дифференцировать влияние специфических и неспецифических факторов при различных методах ПЛС.

PROTEIN AND RNA CONTENT IN RAT n. SUPRAOPTICUS AFTER SLEEP DEPRIVATION

PANOV A. N., KRIVENKO N. E.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

Protein and RNA content in neurons and gliocytes of n. supra-opticus has been determined in rats subjected to sleep deprivation (the animals were placed into a slowly rotating cylindrical tretbahn).

On 24h of sleep deprivation neurons and gliocytes enlarged for 56% and 23%, respectively; but on the 48h of insomnia the size of neurons dropped to normal and that of gliocytes remained enlarged for 15%. RNA concentrations in the cells didn't change in the course of investigation; protein concentration decreased in a day both in neurons and gliocytes for 20 and 17%, respectively. The amount of RNA and protein per cell in neurons increased only after one-day insomnia for 53% and 25%, respectively; in gliocytes only protein content increased after 48h of insomnia.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Jouvett M. *Ergebn. Physiol.*, 64, 166—307, 1972.
2. Giuditta A.—In: *Biochemical correlates of brain structure and function*, L.—N. Y.—San-Francisco, p. 293—337, 1977.
3. Демин Н. Н., Коган А. Б., Моисеева Н. Н. *Нейрофизиология и нейрохимия сна*, Л., Наука, 189 с., 1978.
4. Воронка Г. Ш. *Содержание белков в нейронах и нейроглии супраоптического и красного ядер головного мозга крысы при естественном сне, наркозе и бессоннице*. Канд. дис. Л., 1970.
5. Воронка Г. Ш., Демин Н. Н., Певзнер Л. З. *ДАН СССР*, 198, 974—977, 1971.
6. Воронка Г. Ш., Демин Н. Н., Рубинская Н. Л., Соловьева Н. А. *Укр. біохім. ж.*, 44, 712—717, 1972.
7. Маликов У. М., Панов А. Н. *Физиол. ж. СССР*, 66, 923—925, 1980.

8. Маликов У. М., Панов А. Н. Физиол. ж. СССР, 67, 1506—1510, 1981.
9. Панов А. Н., Маликов У. М. Цитология, 23, 1381—1385, 1981.
10. Покровский А. А., Малахов И. Е., Кушманова О. Д. Бюл. exper. биол. и мед., 63, 6, 123—125, 1967.
11. Berube G. R., Powers M. M., Kerkay J., Clark G. Stain Technol., 41, 73—81, 1966.
12. Geyer G. Acta Histochem., 10, 286—292, 1960.
13. Певзнер Л. З. Функциональная биохимия нейроглии, Л., Наука, 180 с., 1972.
14. Wünscher W., Schober W., Werner L. Architektonischer Atlas vom Hirnstamm der Ratte, Leipzig, 1965.
15. Jacobs B. L.—In: Current studies of hypothalamic function, v. 2, p. 138—148, Basel, 1978.
16. Pevzner L. Z. J. Neurochem., 12, 993—1002, 1965.
17. Oswald I. New Scientist, 46, 170—172, 1970.
18. Демин Н. Н.—В кн.: Физиология и патология сна человека, М., Наука, с. 21—33, 1975.

Институт физиологии
им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Поступила 8. IV 1982