

УДК 612.82:577.1

## НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНАПТОСОМ ИЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС, ЛИШЕННЫХ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА

НИЛОВА Н. С.

Показано, что по метаболическому ответу на изменение содержания одновалентных катионов и  $\text{Ca}^{2+}$  в среде инкубации синапсомы, полученные из мозга крыс с нарушением сна, могут отличаться от синапсомы нормальных животных. В опытах *in vitro* наблюдали изменение чувствительности дыхания синапсомы из больших полушарий и ствола головного мозга крыс, подвергнутых лишению парадоксальной фазы сна: ингибирование дыхания на глутамине в присутствии  $\text{Na}^+$  в пониженной концентрации усиливалось, активация дыхания в ответ на деполяризацию вследствие увеличения содержания  $\text{K}^+$  уменьшалась. В то же время изменение дыхания синапсомы в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  оказалось аналогичным изменению дыхания при нарушении сна: добавление  $\text{Ca}^{2+}$  не влияло на эффект нарушения сна на дыхание. Совпадение эффектов лишения парадоксальной фазы сна подопытных животных и прибавления  $\text{Ca}^{2+}$  в среду инкубации было отмечено также при исследовании сорбции рутениевого красного синапсомы из головного мозга крыс. Полученные данные могут свидетельствовать о возможности конформационных перестроек синаптических мембран при нарушении сна.

В настоящее время установлено, что при естественном сне головной мозг находится в активном состоянии, отличающемся по своему характеру от бодрствования. Ряд биохимических данных [1—3] позволяет предположить, что во время сна ликвидируются те конформационные изменения мембран (в первую очередь синаптических), которые постепенно развиваются во время бодрствования [3—5]. Для репаративных процессов именно в нейронах особенно нужна парадоксальная фаза сна (ПФС). Однако экспериментальные данные об альтерации клеточных мембран при нарушении сна немногочисленны и косвенны.

Альтерация синаптических мембран при нарушении сна, сопровождающаяся изменением уровня возбудимости нейронов, может выражаться, в частности, в перераспределении ионов по поверхности синаптических мембран, в изменении проницаемости к  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , в перераспределении этих катионов (особенно  $\text{Ca}^{2+}$ ) в синаптической области.

Поэтому представляется важным изучить метаболический ответ синапсомы, выражающийся в изменении дыхания, при различном ионном составе среды инкубации в условиях лишения животных ПФС; привлекает внимание также и возможность сдвигов сорбционных свойств синап-

наптических мембран. Результаты отдельных серий опытов были опубликованы ранее [6—8].

### Материалы и методы

Опыты ставили на белых крысах-самцах массой 160—180 г. Лишенные ПФС производили помещением животных на 24 ч на небольшие площадки, окруженные водой [9]. Контролем служили животные, которые содержались в обычных клетках.

Синапсосомы получали низкоскоростным центрифугированием в градиенте плотности сахарозы [10]. Дыхание регистрировали в аппарате Варбурга. Средой инкубации служила следующая смесь (в мМ):  $\text{Na}^+$ —124,  $\text{K}^+$ —5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ —1,2,  $\text{MgSO}_4$ —1,3, трис — 30 при pH 7,35. В отдельных сериях опытов концентрация  $\text{Na}^+$  составляла 7,5,  $\text{K}^+$ —50 и  $\text{Ca}^{2+}$ —0,15 мМ. Субстратом дыхания служил глутамин или пируват в концентрации 5 мМ. Пробы содержали 7—9 мг белка. Белок определяли по Lowry и соавт. [11]. Сорбцию рутениевого красного анализировали по методу Левина и сотр. [12]. Условия инкубации проб описаны ранее [8].

### Результаты и обсуждение

В первых сериях опытов исследовали дыхание синапсосом в среде с пониженным содержанием  $\text{Na}^+$  (7,5 мМ). Результаты экспериментов представлены в табл. 1. Из этих данных следует, что дыхание синапсосом из больших полушарий и ствола головного мозга контрольных животных оказалось нечувствительным к понижению концентрации  $\text{Na}^+$  в

Таблица 1  
Влияние лишения парадоксальной фазы сна (ПФС) на дыхание на глутамине синапсосом головного мозга крыс при различном содержании  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  в среде инкубации (в мкмоль  $\text{O}_2/10$  мг белка/ч)

| Состояние животного | Большие полушария<br>$\text{Na}^+$ (мМ) |                                 |                                    | Стволовая часть головного мозга<br>$\text{Na}^+$ (мМ) |                                 |                                    |
|---------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
|                     | 124                                     | 7,5                             | 7,5+ $\text{Ca}^{2+}$<br>(0,15 мМ) | 124                                                   | 7,5                             | 7,5+ $\text{Ca}^{2+}$<br>(0,15 мМ) |
| Контроль            | 1,77±0,09<br>(18)                       | 1,62±0,07<br>(17)               | 1,45±0,05<br>(18)<br>$p < 0,05$    | 1,27±0,09<br>(11)                                     | 1,24±0,07<br>(13)               | 1,03±0,10<br>(12)<br>$p < 0,05$    |
| Лишение ПФС, 24 ч   | 1,77±0,07<br>(20)                       | 1,51±0,07<br>(20)<br>$p < 0,01$ | 1,48±0,06<br>(20)                  | 1,25±0,04<br>(12)                                     | 1,03±0,07<br>(11)<br>$p < 0,02$ | 1,03±0,07<br>(12)                  |

среде инкубации при использовании глутамина в качестве субстрата дыхания. Это подтверждают и литературные данные о том, что основная система транспорта глутамина в синапсосомы не зависит от  $\text{Na}^+$  [13]. Дыхание же синапсосом из головного мозга крыс, лишенных ПФС, становилось чувствительным к уменьшению концентрации  $\text{Na}^+$  в среде инкубации: происходило статистически достоверное снижение потребления кислорода на 15% синапсосомами больших полушарий и на 18%

синапсами стволовой части мозга. Это изменение чувствительности к  $\text{Na}^+$  косвенно свидетельствует об альтерации синаптических мембран при нарушении сна, что может проявляться в изменении работы некоторых переносчиков, в частности глутаминна. Видимо, такая альтерация невелика и носит локальный характер.

Это заключение подтверждают результаты опытов, поставленных в аналогичных условиях с использованием в качестве субстрата дыхания глутамата [6]. Дыхание синапсом из головного мозга контрольных животных на глутамате было чувствительно к уменьшению концентрации  $\text{Na}^+$  в среде инкубации: ингибирование потребления кислорода составляло 27–34%. На фоне таких достаточно больших сдвигов эффектов собственно нарушения сна на дыхание уже не наблюдали.

В последующих сериях опытов [7] изучали дыхание синапсом в условиях деполяризации на фоне нарушения сна животных. Деполяризацию вызывали повышением содержания  $\text{K}^+$  в среде инкубации с 5 до 50 мМ. Многочисленные литературные данные указывают на то, что метаболический ответ синапсом на деполяризующее воздействие включает целый ряд компонентов: усиление дыхания и аэробного гликолиза,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый выброс медиаторов, увеличение связывания  $\text{Ca}^{2+}$ , структурные перестройки мембран вследствие лабильзации белок-липидных связей и усиления фосфорилирования белков [14–16].

Данные, характеризующие дыхание синапсом на пирувате в условиях деполяризации и при лишении крыс ПФС в течение 24 ч, представлены в табл. 2. Они показывают, что повышение концентрации  $\text{K}^+$  до 50 мМ вызывало активацию на 20–24% дыхания синапсом, выделенных из головного мозга контрольных животных, если субстратом дыхания служил пируват. Этот хорошо известный метаболический ответ на деполяризацию имеет, по всей видимости, сложную природу. Помимо повышения дыхания, он включает усиление аэробного гликолиза и активацию пируватдегидрогеназы [17, 18]. Пусковым механизмом может служить уменьшение количества АТФ [18], возможно, вследствие активации фосфорилирования белков синаптических мембран [16].

Синапсомы, выделенные из головного мозга крыс, лишенных ПФС, отличались пониженной чувствительностью к деполяризующему воздействию  $\text{K}^+$ : усиление дыхания в этих условиях было менее выражено, чем в контроле, и составляло 12% для синапсом больших полушарий и 9% для синапсом ствола. Возможно, что такое уменьшение метаболического ответа синапсом на деполяризующее воздействие является отражением уже существующего возбуждения, развивающегося в синаптических структурах при нарушении сна. Результатом этого может быть понижение возбудимости синаптических мембран и пониженная способность отвечать на деполяризацию.

Одновременно с изменением концентрации  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в среде инкубации исследовали эффект  $\text{Ca}^{2+}$  в небольших концентрациях на дыхание синапсом из головного мозга лишенных ПФС крыс.

Таблица 2

Влияние лишения парадоксальной фазы сна (ПФС) на дыхание на пирувате синапсом головного мозга крыс при различном содержании  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  в среде инкубации (в  $\mu$ моль  $O_2/10$  мг белка/ч)

| Состояние животного  | Большие полушария       |                                        |                                      |                                       | Стволовая часть головного мозга |                                       |                                      |                                       |
|----------------------|-------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
|                      | в отсутствие $Ca^{2+}$  |                                        | в присутствии $Ca^{2+}$<br>(0,15 мМ) |                                       | в отсутствие $Ca^{2+}$          |                                       | в присутствии $Ca^{2+}$<br>(0,15 мМ) |                                       |
|                      | $K^+$ (5 мМ)            | $K^+$ (50 мМ)                          | $K^+$ (5 мМ)                         | $K^+$ (50 мМ)                         | $K^+$ (5 мМ)                    | $K^+$ (50 мМ)                         | $K^+$ (5 мМ)                         | $K^+$ (50 мМ)                         |
| Контроль             | $2,93 \pm 0,09$<br>(19) | $3,52 \pm 0,09$<br>(19)<br>$p < 0,001$ | $3,03 \pm 0,09$<br>(17)              | $3,01 \pm 0,11$<br>(17)               | $2,45 \pm 0,07$<br>(13)         | $3,3 \pm 0,07$<br>(13)<br>$p < 0,001$ | $2,48 \pm 0,10$<br>(13)              | $2,83 \pm 0,09$<br>(13)<br>$p < 0,05$ |
| Лишение ПФС,<br>24 ч | $3,10 \pm 0,09$<br>(19) | $3,47 \pm 0,13$<br>(19)<br>$p < 0,05$  | $3,06 \pm 0,12$<br>(20)              | $3,43 \pm 0,14$<br>(20)<br>$p < 0,05$ | $2,42 \pm 0,06$<br>(13)         | $2,63 \pm 0,07$<br>(13)<br>$p < 0,05$ | $2,38 \pm 0,10$<br>(13)              | $2,70 \pm 0,07$<br>(13)<br>$p < 0,05$ |

$p$ —достоверность различия между пробами, содержащими  $K^+$  в концентрации 5 мМ и 50 мМ

Как видно из табл. 1, добавление  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации 0, 15 мМ на фоне пониженного содержания  $\text{Na}^+$  вызывало в контроле статистически достоверное уменьшение дыхания синапсом в различных отделах головного мозга на 11—17% по отношению к пробам с пониженным содержанием  $\text{Na}^+$  и без  $\text{Ca}^{2+}$  в среде. Влияние  $\text{Ca}^{2+}$  на окисление может быть двояким—на уровне митохондрий и на уровне поступления окисляемого субстрата. С одной стороны,  $\text{Ca}^{2+}$  способен угнетать NAD-зависимое окисление субстратов, вызывая утечку адениннуклеотидов из митохондрий [19]; с другой стороны,  $\text{Ca}^{2+}$  может ингибировать поступление субстратов окисления в синапсомы, связываясь с синаптическими мембранами и вызывая альтерацию переносчиков.

Приведенные в табл. 1 данные показывают, что добавление  $\text{Ca}^{2+}$  в среду инкубации синапсом, выделенных из головного мозга крыс, лишенных ПФС, не вызывало какого-либо дополнительного изменения дыхания по сравнению с пробам, содержащими  $\text{Na}^+$  в пониженной концентрации в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$ . Таким образом, изменение дыхания синапсом, выделенных из головного мозга лишенных ПФС крыс, на фоне пониженного содержания  $\text{Na}^+$  было таким же, как если бы здесь уже присутствовал  $\text{Ca}^{2+}$ , и его добавление не вызывало существенных сдвигов в дыхании синапсом,

Близость эффектов предшествовавшего нарушения сна животного и добавления извне  $\text{Ca}^{2+}$  в среду инкубации наблюдали и при исследовании дыхания синапсом в условиях деполяризации (табл. 2). В контроле добавление  $\text{Ca}^{2+}$  вызывало уменьшение метаболического ответа на деполяризующее воздействие  $\text{K}^+$  в высоких концентрациях: деполяризация не вызывала усиления дыхания синапсом из больших полушарий, а в синапсомах ствола оно составляло всего 14%. В контроле активация дыхания достигала 20% у синапсом больших полушарий и 24% у синапсом стволовой части. При нарушении сна в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  метаболический ответ синапсом также ослабевал: в ответ на деполяризующее воздействие наступала активация дыхания всего на 12% в синапсомах больших полушарий и на 9% в синапсомах ствола. Добавление  $\text{Ca}^{2+}$  на фоне лишения ПФС не вызывало какого-либо дополнительного эффекта на дыхание синапсом по сравнению с тем, что давало только нарушение сна при инкубации проб в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$ . Активация дыхания в данном случае составляла 12% для синапсом из больших полушарий и 13% для синапсом ствола.

Таким образом, приведенные результаты экспериментов могут быть косвенным свидетельством альтерации синаптических мембран при нарушении сна, что проявлялось в изменении чувствительности дыхания синапсом к изменению концентрации  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$  в среде инкубации. Изменение дыхания при прибавлении  $\text{Ca}^{2+}$  в небольшой концентрации имело ту же направленность, что и изменение дыхания синапсом мозга крыс, лишенных ПФС; вследствие этого  $\text{Ca}^{2+}$  на фоне на-

рушения сна не изменял эффект лишения ПФС на дыхание синапсом.

Более отчетливо взаимоотношения эффектов добавленного извне  $\text{Ca}^{2+}$  и влияния лишения ПФС на свойства синаптических мембран проявлялись при изучении сорбции рутенневого красного—крупного шестивалентного катиона (табл. 3) [8].

Таблица 3

Влияние лишения ПФС на связывание рутенневого красного синапсосами головного мозга крыс

| Состояние животного | Кора больших полушарий                                       |                                           | Стволовая часть головного мозга            |                                |
|---------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------|
|                     | количество связанного красителя моль, кг белка $\times 10^2$ |                                           |                                            |                                |
|                     | в отсутствие $\text{Ca}^{2+}$                                | в присутствии $\text{Ca}^{2+}$            | в отсутствие $\text{Ca}^{2+}$              | в присутствии $\text{Ca}^{2+}$ |
| Контроль            | $0,880 \pm 0,006$<br>(27)                                    | $0,510 \pm 0,007$<br>(21)<br>$p < 0,01$   | $0,390 \pm 0,005$<br>(26)                  | $0,340 \pm 0,005$<br>(27)      |
| Лишение ПФС, 24 ч   | $0,430 \pm 0,001$<br>(26)<br>$p^* < 0,001$                   | $0,350 \pm 0,003$<br>(26)<br>$p^* < 0,01$ | $0,260 \pm 0,002$<br>(30)<br>$p^* < 0,001$ | $0,310 \pm 0,005$<br>(20)      |

$p$ —вероятность достоверности различий связанного красителя в присутствии и в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$

$p^*$ —то же в контроле и при лишении ПФС

Лишение ПФС приводило к уменьшению числа мест связывания красителя на 51% синапсосами коры больших полушарий и на 31% синапсосами ствола. Добавление же  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации 0,5 мМ вызывало уменьшение числа мест связывания синапсосами коры на 42% и практически не влияло на сорбцию рутенневого красного синапсосами ствола (уменьшение числа мест связывания в данном случае статистически недостоверно). Если сравнить сорбцию рутенневого красного синапсосами головного мозга при лишении ПФС в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  с сорбцией красителя синапсосами контрольных животных также в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ , то видно, что эффект лишения ПФС на изменение числа мест связывания рутенневого красного уменьшался при наличии  $\text{Ca}^{2+}$ ; снижение числа мест связывания в коре составляло 31% (против 51% в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$ ), а уменьшение числа мест связывания красителя синапсосами ствола становилось статистически недостоверным. Эти данные свидетельствуют об определенных конформационных изменениях синаптических мембран при нарушении сна. Возможно также, что изменение конформации, происходящее при лишении животных ПФС и вызываемое присутствием  $\text{Ca}^{2+}$  в среде инкубации, затрагивает хотя бы частично одни и те же центры связывания красителя.

Идентифицировать центры связывания рутенневого красного и  $\text{Ca}^{2+}$  в синапсосах в настоящее время затруднительно. Этот краси-

тель и катион связываются с широким спектром кислых групп различных биополимеров, в особенности гликопротеинов, гликолипидов и фосфолипидов. Ганглиозиды и некоторые гликопротеины вносят значительный вклад в поверхностный отрицательный заряд синапсом [20]. Можно допустить, что изменение сорбции рутениевого красного синапсом из головного мозга крыс, подвергнутых лишению ПФС, было связано с перераспределением зарядов, вызванным изменением ориентации гликопротеинов и гликолипидов, определяющих конфигурацию и уровень возбудимости синаптических мембран. Присутствующий в среде инкубации  $\text{Ca}^{2+}$  может отчасти связываться теми же центрами. Возможно также некоторое перераспределение  $\text{Ca}^{2+}$  внутри синапсом и при нарушении сна. Этим можно объяснить параллельность эффектов добавленного извне  $\text{Ca}^{2+}$  и последствий нарушения сна на некоторые метаболические характеристики синапсом.

Следует отметить, что установленные эффекты лишения ПФС на дыхание синапсом при изменениях ионного состава среды инкубации невелики по абсолютным величинам и носят однозначный характер—картина аналогична для синапсом из больших полушарий и ствола головного мозга. По-видимому, речь идет о небольших альтерациях синаптических мембран, отражающих пластичность синапсов в ответ на развитие такого стресса, как нарушение сна.

## ON BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF BRAIN SYNAPTOSOMES IN RATS DEPRIVED FROM PARADOXICAL PHASE OF SLEEP

NILOVA N. S.

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

The metabolic response of brain stem and hemispheres' synaptosomes to the shift in ion's content in the media has been studied in rats deprived from the paradoxical phase of sleep. Under these conditions the respiration of synaptosomes was less sensible to activation in the depolarizing media (elevated  $\text{K}^+$ ) and more sensible to inhibition in the presence of low  $\text{Na}^+$  (in vitro). At the same time changes in the respiration of synaptosomes in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  in control animals were similar to those in animals deprived from sleep. Another evidence to the similarity of effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and sleep deprivation was detected in the test with ruthenium red sorbtion by synaptosomes. Data obtained point to the possible conformational reorganization of synaptic membranes on sleep deprivation.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Giuditta A.—In: Biochemical correlates of brain structure and function (ed. A. N. Davison), L., 293—337, 1977.
2. Karnovsky M. L., Reich P.—In: Adv. in neurochemistry (eds. B. W. Agranoff, M. H. Aprison), 2, N. Y., p. 213—275, 1977.

3. Демин Н. Н., Коган А. Б., Моисеева Н. И. Нейрофизиология и нейрохимия сна, Л., Наука, 1978.
4. Демин Н. Н.—В кн.: Цитохимические корреляты торможения нейронов (под ред. Л. З. Певзнера), Л., Наука, с. 18—39, 1978.
5. Демин Н. Н. Нейрохимия, 1, 20—26, 1982.
6. Нилова Н. С. Физиол. ж. СССР, 65, 352—356, 1979.
7. Нилова Н. С. Физиол. ж. СССР, 67, 1324—1328, 1981.
8. Нилова Н. С. Цитология, 22, 1081—1084, 1980.
9. Jouvet D., Vimont P., Delorme F. C. r. Soc. biol., 158, 756—759, 1964.
10. Hajos F. Brain Res., 93, 485—489, 1975.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1961.
12. Тугай В. А., Левин С. В., Курский М. Д. Цитолгия, 15, 1103—1109, 1973.
13. Roberts P. J., Keen P. Brain Res., 67, 352—357, 1974.
14. Belleruche J. S. de, Bradford H. S. J. Neurochem., 21, 495—505, 1973.
15. Bradford N. S., Bennet G. W., Thomas A. J. J. Neurochem., 21, 495—505, 1973.
16. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н., Маликова Л. А., Родина Б. И., Ротанец В. В., Сандалов Ю. Г., Швец В. Н. Биохимия, 41, 975—981, 1976.
17. Bull R. J., Lutkenhoff S. D. J. Neurochem., 21, 913—922, 1973.
18. Kovachich G. B., Haugaard N. J. Neurochem., 28, 923—927, 1977.
19. Vinogradov A., Scarpa A., Chance B. Arch. Biochem. Biophys., 152, 646—654, 1972.
20. Garcia-Segura L. M., Martinez-Rodriguez R., Martinez-Murillo R., Bodonez E., Toledano A. Acta histochem., 61, 89—97, 1978.

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

Поступила 10. VIII 1982