НЕЙРОХИМИЯ

т. 9, № 1, 1990

УДК 612.822.1+612.821.7

ВЛИЯНИЕ НАРУШЕНИЙ СНА НА АКТИВНОСТЬ АТРаз НЕЙРОНОВ И ГЛИОЦИТОВ ГИППОКАМПА У КРЫС, СЕЛЕКТИРОВАННЫХ ПО ПОРОГУ ВОЗБУДИМОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

ТАРАНОВА И. П., КЛЕНИКОВА В. А., ВАНДО А. П., ШИРЯЕВА Н. В., КУЛАГИН Д. А., ЛОПАТИНА Н. Г.

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

Цитофотометрическим методом исследована активность Na^+, K^+-АТРазы нейронов и глиоцитов гиппокампа у крыс двух линий, селектированных по порогу возбудимости. Показано, что в норме у крыс обеих линий активность Na^+, K^+-АТРазы, и Mg^{2+}-АТРазы в глиоцитах соответственно в 4 и 6 раз выше, чем в нейронах. При этом у крыс с высоким порогом возбудимости активность Na^+, K^+-АТРазы в нейронах оказалась на 50% выше, чем у крыс с низким порогом возбудимости. Депривация парадоксальной фазы сна вызывала резкое, в 2,4 раза повышение активности этого фермента в нейронах гиппокампа у крыс обеих линий. Выявлены также изменения функционального состояния периферической нервной системы и ЦНС. Обнаружено повышение возбудимости периферического отдела НС, наиболее резко выраженное у крыс с высоким порогом возбудимости. Функциональные сдвиги в ЦНС после депривации приводили к снижению способности к образованию условного рефлекса активного избегания у крыс с низким порогом возбудимости. В то же время известный амнезический эффект депривации парадоксальной фазы сна четко проявился лишь у крыс с низкой возбудимостью НС. Предполагается, что резкое повышение активности Na^+, K^+-АТРазы в нейронах гиппокампа является одной из причин изменения уровня их активации и в значительной мере обусловливает развитие нарушений условнорефлекторной деятельности животных после длительных нарушений сна.

Депривация сна или длительные его нарушения вызывают заметные сдвиги в функциональном состоянии ЦНС и в поведении, повышение возбудимости коры и других структур мозга, появление агрессивности, гиперфагии, нарушение обучения и консолидации следов памяти как у экспериментальных животных, так и у человека [1, 2]. В основе этих нарушений, по-видимому, лежат изменения некоторых метаболических процессов в мозгу. Так, например, показано, что избирательное лишение крыс парадоксальной фазы сна (ПФС) в течение 24 ч приводит к перестройке метаболизма белков и нуклеиновых кислот в нейронах и глиоцитах некоторых структур мозга [3], вызывает ряд биохимических изменений непосредственно в си-

наптосомах [4, 5], а также развитие конформационных изменений в синаптических мембранах [6]. В некоторых отделах мозга были отмечены также изменения активности мембраносвязанных ферментов, в частности АТРаз [7], что подтверждает представления о том, что биохимическая модификация мембранных структур клеток мозга в условиях длительных нарушений сна не может не отразиться на функциях клеточных мембран нейронов и глии [4, 5].

Поскольку Na^+, K^+-АТРаза обеспечивает транспорт ионов через возбудимые мембраны, генерацию трансмембранного потенциала, непосредственно влияя на возбудимость нервной клетки, а также на освобождение и поглощение нейротрансмиттеров, значительный интерес представляет вопрос, существует ли какая-либо зависимость между активностью АТРаз мозга и уровнем возбудимости НС. Известно, что порог возбудимости является одним из основных параметров в оценке функционального состояния НС, и показано, что линии крыс, селектированные по порогу возбудимости периферического отдела НС, аналогичным образом различаются по пороговым характеристикам возбудимости и центральных отделов НС [8, 9]. Принимая во внимание важную роль гиппокампа в процессах обучения и регуляции поведения, в настоящей работе мы ставили задачу провести сравнительное исследование активности АТРаз в нейронах и глиоцитах гиппокампа у крыс двух линий, селектированных по порогу возбудимости. Поскольку ПФС находится под контролем тета-ритма гиппокампа [2], представляло интерес также выявить характер изменения активности этих ферментов и функционального состояния периферических и центральных отделов НС после 24-часового лишения ПФС у крыс этих линий в зависимости от исходного уровня возбудимости НС.

Материалы и методы

Опыты ставили на крысах-самцах линий, селектированных по высокому (ВП, в среднем 2,72 В) и низкому (НП, 0,48 В) порогам возбудимости большеберцового нерва 18—20-го поколения отбора в возрасте 5 месяцев [8]. Животных выращивали в условиях лабораторного вивария при 12-часовом световом дне и комнатной температуре на стандартном рационе, дававшемся неограниченно. Лишение ПФС вызывали по методу Jouvet и соавт. [10] с использованием малых площадок. Активность АТРаз определяли на нефиксированных свежезамороженных срезах гиппокампа толщиной 10 мкм, гистохимическим методом Wachstein, Meisel [11] в нашей модификации [7], которая позволяет количественно оценить активность АТРаз в отдельных клетках на срезах головного мозга крысы. Оптическую плотность окраски продуктов АТРазной реакции в клетках измеряли методом 2-волновой цитофотометрии [12] на микроскопе-фотометре МЦФУ-1 при длинах волн 505 и 615 нм. Суммарную активность АТРаз выражали в единицах оптической плотности ($\times 10$) в пересчете на 1 мин инкубации. Активность Na^+, K^+-АТРазы вычисляли по разнице между суммарной активностью АТРаз и активностью Mg^{2+}-АТРазы, выявляемой в присутствии специфического ингибитора Na^+, K^+-АТРазы оуабаина. Учитывая, что нейроны и глиоциты различаются по размерам клеток и условиям фотометрирования (увеличение, площадь зонда), для сравнения активности АТРаз двух типов клеток вычисляли У. А. АТРаз, в расчете на единицу фотомет-

рируемой площади (на 1 мкм). Среднее арифметическое величины активности АТРаз нейронов и глиоцитов для каждого животного находили по данным фотометрии 20—25 клеток. Статистическую обработку всего цифрового материала (по 80—90 клеток от животных каждой экспериментальной группы) проводили по непараметрическому критерию Розенбаума [13].

Пороги возбудимости большеберцового нерва определяли по двигательной реакции задней конечности крысы при действии прямоугольных стимулов длительностью 50 мс [14]. Эти изменения проводили до начала и сразу после окончания 24-часового лишения ПФС. Одновременно проводили определение порога возбудимости у контрольных животных тех же линий, находившихся в обычных клетках в том же помещении, что и подопытные животные.

Влияние депривации ПФС на функциональное состояние центральных отделов НС оценивали по скорости выработки условного рефлекса активного избегания (УРАИ) и по уровню сохранения условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Обучение УРАИ (100 сочетаний условного и безусловного раздражения) проводили по методу В. К. Федорова (1974) сразу после депривации ПФС.

Выработку УРПИ проводили непосредственно перед началом депривации ПФС [16]. Сохранение УРПИ проверяли дважды: через 15 мин и 20 ч после прекращения депривации ПФС. Параллельно тестировали по всем методикам контрольных крыс. Статистическую обработку результатов проводили по критериям Стьюдента, а также Вилкоксона-Манна-Уитни [13].

Результаты и обсуждение

Активность АТРаз определяли в пирамидных нейронах зоны CA_3 гиппокампа и в перинейрональных сателлитных глиоцитах.

Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что у контрольных крыс обеих исследованных линий активность как Na^+, K^+-АТРазы, так и Mg^{2+}-АТРазы в глиоцитах соответственно в 4 и 6 раз

Таблица 1

Удельная активность (У. А.) АТРаз нейронов и глиоцитов зоны CA_3 гиппокампа у крыс двух линий, селектированных по порогу возбудимости НС

Линии крыс	У. А. АТРаз (10^4имп мкм^2)		
	Общая АТРаза	Na^+, K^+-АТРаза	Mg^{2+}-АТРаза
	НЕЙРОНЫ		
Линия ВП (высокий порог)	2,90±0,09	1,00±0,09	1,90±0,11
Линия НП (низкий порог)	2,18±0,07 $p<0,02$	0,50±0,05 $p<0,05$	1,65±0,05 $p<0,05$
	ГЛИОЦИТЫ		
Линия ВП (высокий порог)	22,8±1,1	9,7±0,1	13,1±0,4
Линия НП (низкий порог)	20,9±0,7	9,1±0,7	10,0±0,6 $p<0,02$

выше, чем в нейронах, что подтверждают результаты, полученные нами ранее при цитофотометрическом исследовании активности АТРаз мозга у крыс линии *Wistar*, разводящихся без отбора [7], и согласуются с данными литературы, полученными на обогащенных глиальных и нейрональных фракциях [17]. Такой высокий уровень активности АТРаз глии, по-видимому, и обеспечивает поддержание более высокого трансмембранного потенциала глиальных клеток в покое по сравнению с нейронами [18]. Кроме того, выявились и некоторые межлинейные различия. Так, у крыс с высоким порогом возбудимости (линия ВП), находящихся в состоянии относительного физиологического покоя активность Na^+, K^+-АТРазы в нейронах оказалась на 50% выше, чем у крыс с низким порогом возбудимости. Активность Mg^{2+}-АТРазы и в нейронах, и в глиоцитах у этих крыс тоже оказалась примерно на 20% выше, чем у крыс линии НП.

Депривация ПФС в течение 24 ч приводила у крыс линии НП к значительному повышению общей активности АТРаз в нейронах гиппокампа (на 38—40%) за счет резкого повышения (в 2,4 раза) активности Na^+, K^+-АТРазы (рис. 1). По-видимому, это связано с

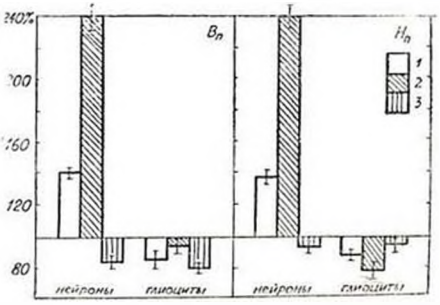


Рис. 1. Влияние 24-часовой депривации парадоксальной фазы сна на активность АТРаз нейронов и глиоцитов зоны CA_3 гиппокампа у крыс с высоким (Вп) и низким порогом (Нп) возбудимости НС. За 100% принят уровень активности АТРаз у контрольных животных, не подвергавшихся депривации парадоксальной фазы сна, $p<0,05$. *1*—общая АТРаза, *2*— Na^+,K^+-АТРаза, *3*—Mg^{2+}-АТРаза

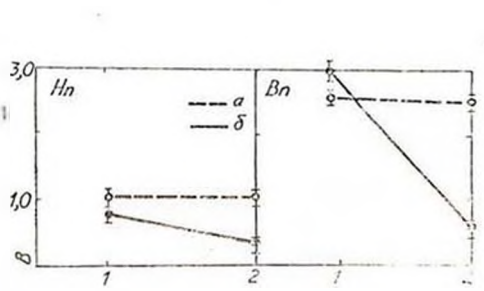
длительным возбуждением и активацией нейронов гиппокампа при депривации ПФС и активным поступлением Na^+ внутрь клетки. Обычно Na^+-насос работает ниже его максимальной способности и любое увеличение концентрации внутриклеточного Na^+ активирует работу насоса [19], чтобы обеспечить удаление избытка Na^+ из клетки. В глиальных клетках, напротив, активность этого фермента несколько снижалась (на 24%). Физиологические изменения концентрации экстраклеточного K^+ мало влияют на активность Na^+-насоса, но отмеченное нами снижение активности глиальной Na^+, K^+-АТРазы может затруднить поглощение глиоцитами увеличенно-

го количества K^+, поступившего из нейронов в межклеточную среду, и привести к деполяризации клии [20].

У крыс линии ВП после депривации ПФС также обнаружено резкое повышение активности Na^+, K^+-АТРазы в нейронах, в 2,4 раза (рис. 1), но при этом происходило некоторое снижение активности Mg^{2+}-АТРазы (на 16%). Поскольку Mg^{2+}-АТРаза обеспечивает захват нейротрансмиттеров в синаптические везикулы [19], то снижение ее активности в нейронах гиппокампа у крыс линии ВП, повидимому, может привести к нарушению синаптических процессов.

В глиоцитах гиппокампа этой линии крыс в отличие от линии НП, уровень активности Na^+, K^+-АТРазы при лишении ПФС практически не изменялся, но при этом снижалась активность Mg^{2+}-АТРазы примерно на 21% (рис. 1).

Таким образом, депривация ПФС вызывала резкое повышение активности Na^+, K^+-АТРазы в нейронах гиппокампа у крыс линий НП и ВП. В то же время активность Mg^{2+}-АТРазы достоверно снижалась как в нейронах, так и в глиоцитах, но только у крыс с низкой возбудимостью (линия ВП), что и составляет главное отличие функционального ответа АТРаз, этих мембраносвязанных ферментов клеток гиппокампа, на такую длительную функциональную нагрузку, как 24-часовое лишение ПФС.



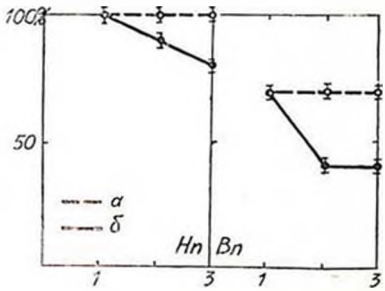


Рис. 2. Влияние 24-часовой депривации парадоксальной фазы сна на пороги возбудимости нервно-мышечного аппарата у крыс линии ВП и НП. По оси ординат—значение порога возбудимости (В). *а*—контрольная группа крыс, *б*—крысы, подвергавшиеся 24-часовой депривации парадоксальной фазы сна. *1*—до опыта, *2*—после опыта

Рис. 3. Влияние 24-часовой депривации парадоксальной фазы сна на сохранение условного рефлекса пассивного избегания у крыс линий ВП и НП. По оси ординат—процент крыс, получивших электрический ток. *а*—контрольная группа крыс, *б*—крысы, подвергавшиеся депривации парадоксальной фазы сна. *1*—до опыта, *2*—после опыта, *3*—через 20 ч после опыта

Исследование влияния депривации ПФС на уровень возбудимости нервно-мышечного аппарата у тех же крыс выявил снижение порога возбудимости у крыс обеих линий (рис. 2), однако более значительное у крыс ВП (в 7,7 раза, а у крыс НП—в 2 раза). Следует отметить, что при этом порог возбудимости у крыс обеих линий достиг практически одинакового, очень низкого предела—0,3—0,4 В. Что касается контрольных животных тех же линий, не подвергавшихся депривации ПФС, то достоверных изменений порога возбудимости за

тот же период у них не отмечено (рис. 2). Таким образом, у крыс обеих линий 24-часовое лишение ПФС приводило к однонаправленному изменению функционального состояния периферического отдела НС—повышению его возбудимости до одинакового, возможно, предельного уровня.

Можно было ожидать, что депривация ПФС вызовет также однонаправленные с периферической НС сдвиги и в функциональном состоянии ЦНС у крыс обеих линий. В пользу этого предположения свидетельствовало наличие генетической связи между порогами возбудимости периферической НС и ЦНС [9], а также между порогами возбудимости ЦНС и способностью животных к обучению [2] и обнаруженные нами в настоящей работе однонаправленные и сходные по глубине изменения активности Na^+, K^+-АТРазы нейронов гиппокампа.

Таблица 2

Влияние 24-часовой депривации ПФС на обучение условного рефлекса активного избегания крыс линии ВП и НП (n=8)

Линия крыс	Условия опыта	Суммарное число условных рефлексов	Суммарное время, необходимое для выполнения избегания.	P
Линия ВП (высокий порог)	Контроль	13,75±4,94	686,46±3,76	
	Депривация ПФС	16,75±3,10	641,86±10,3	
Линия НП (низкий порог)	Контроль	23,25±5,62	611,98±19,6	
	Депривация ПФС	10,25±2,05	685,37±9,3	$p<0.05$

Изучение способности к образованию УРАИ (табл. 2) и сохранению УРПИ (рис. 3) у крыс указанных линий после лишения ПФС подтвердило это предположение. Так, депривация ПФС существенно снизила способность к образованию УРАИ у крыс линии НП (достоверное увеличение времени, необходимого для выполнения избегания), а также почти в два раза сократило количество животных линии ВП, сохранивших УРПИ.

Способность к образованию УРАИ у крыс линии с высоким порогом возбудимости и к сохранению УРПИ у животных линии с низким порогом возбудимости практически не изменялась. Следовательно, депривация ПФС снижает способность к обучению УРАИ преимущественно у животных с высоким исходным уровнем возбудимости, тогда как у крыс с исходно низкой возбудимостью ее резкое повышение после депривации ПФС не обеспечивало сохранения УРПИ, что свидетельствует о нарушении процессов консолидации памяти. Таким образом, амнезический эффект, который носил стойкий характер и даже усиливался при тестировании через 20 ч после прекращения депривации ПФС, четко проявляется лишь у животных с низкой возбудимостью НС.

Ранее нами было показано, что депривация ПФС вызывает у крыс ряд изменений биоэлектрической активности мозга, в том числе исчезновение фазического компонента тета-ритма гиппокампа, появление ирритативных знаков и перераспределение пиков мощности в спектрограммах активации и пространственной синхронизации гиппо-

кампа и коры, то есть с нарушением необходимых условий для процессов образования и упрочения условнорефлекторных связей и для извлечения информации из памяти. Это позволяет думать, что отмеченное нами снижение способности к сохранению УРПИ у крыс линии ВП, в значительной мере обусловлено угнетением тета-ритма и изменением уровня активации нейронов гиппокампа.

По-видимому, обнаруженное нами резкое повышение активности Na^+, K^+-АТРазы в нейронах гиппокампа (рис. 1) является одной из причин изменения уровня активации и в значительной мере обусловливает развитие нарушений условнорефлекторной деятельности животных после длительного лишения их ПФС.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что лишение крыс обеих линий ПФС привело к существенным и однонаправленным сдвигам в активности АТРаз мозга и в функциональном состоянии их НС—как в периферическом, так и центральном отделах, ответственных за выработку и сохранение оборонительных условных рефлексов. Анализ полученных данных позволяет предположить существование определенного оптимума в активности АТРаз мозга, обеспечивающего тот уровень возбудимости, который необходим для консолидации памятного следа и осуществления процесса обучения.

EFFECTS OF SLEEP DISTURBANCES ON THE ACTIVITY OF ATPase OF NEURONS AND GLYOCYTES IN HIPPOCAMPUS OF RATS SELECTED ACCORDING OF THE EXCITATION THRESHOLD OF THE NERVOUS SYSTEM

TARANOVA N. P., KLENIKOVA V. A., VAIDO A. I., SHIRYAEVA N. V., KULAGIN D. A., LOPATINA N. G.

Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

We have analyzed by cytophotometry the activity of Na^+ and K^+-ATPases of hippocampal neurons and gtyocytes of two rat strains selected according to the excitation threshold. In the norm both strains of rats exhibit the activity of Na^+, K^+ and Mg^{2+}- ATPases exceeding that of neurons by a factor of 4 and 6. At the same time, in rats with high excitation threshold the activity of Na^+ and K^+-ATPase in neurons was 50% higher than in rats with low excitation threshold.REM-sleep deprivation lead to abrupt (2,4-fold) increase in the activity of these enzymes in hippocampal neurons of both rat strains. Changes in functional state of the PNS and CNS were noted. PNS was more prone to excitation in rats with low excitation threshold. Functional changes in the CNS after REM-sleep deprivation resulted in diminished capacity to form CRAA in rats with low excitation threshold. At the same time, the well-known amnestic effect of REM-sleep deprivation was clearly present only in rats with low excitation of the CNS. A sharp increase in the activity of Na^+ and K^+-ATPases in hippocampal neurons is a possible causative factor, leading to variation of the activation level; it appears to be responsible for the abnormal reflex activity after prolonged REM-sleep deprivation.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Демин Н. Н., Коган А. Б., Моисеева Н. И.* Нейрофизиология и нейрохимия сна. Л., Наука, 1978.
2. *Oniani T.* —In: Neurobiology of sleep-wakefulness cycle (ed. T. Oniani), p. 19—39, Tbilisi, Metzniereba 1988.
3. *Панов А. Н., Маликов У. М.* Цитология, т. 2, с. 1381—1385, 1981.
4. *Taranova N. P., Luchakova O. S. Neurochem.* Int., v. 13, Suppl. 1, p. 178, 1988.
5. *Таранова Н. П., Нилова Н. С.* Физиол. журн. СССР, т. 72, № 8, с. 1065—1068, 1986.
6. *Нилова Н. С.,* Нейрохимия, т. 3, № 4, с. 392—394, 1984.
7. *Кленикова В. А., Таранова Н. П.* Физиол. журн. СССР, т. 74, № 4, с. 490—496, 1988.
8. *Зимкина А. М.* —В кн.: Функциональные состояния мозга. М., МГУ, с. 6—20, 1975.
9. *Александрова Н. П., Ширяева Н. В., Кратин Ю. Г., Лопатина Н. Г.* Докл. АН СССР, т. 259, № 5, с. 1233—1235, 1981.
10. *Jouvet D., Vimont P., Delorme F., Jouvet M.* Compt. rend. Soc. biol., v. 158, p. 756—759, 1964.
11. *Wachstein M., Meisel E.* Amer. J Clin. Pathol., v. 27, № 1, p. 13—17, 1957.
12. *Агроскин Л. С., Папаян Г. В.* Цитофотометрия, Л., Наука, 1977.
13. *Урбах В. Ю.* Математическая статистика для биологов и медиков, М., Изд-во АН СССР, 1963.
14. *Вайдо А. И., Ситдиков М. Х.* Генетика, т. 15, № 1, с. 144—146, 1979.
15. *Федоров В. К., Ситдиков М. Х.* Журн. ВНД, т. 24, в 2, с. 431—433, 1974.
16. *Федоров В. К., Ситдиков М. Х., Ширяева Н. В.* Журн. ВНД, т. 22, в. 3, с. 624—627, 1972.
17. *Peuzner L.* Oligodendrocytes. —In. Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha) v. 1, p. 357—395, 1983.
18. *Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н.* Функциональная биохимия синапсов. М., Медицина, 1979.
19. *Rossier B. C., Geering K., Kraehenbuhl J. P.* Trends Biochem Sci., v. 12, № 2 p. 483—487, 1987.
20. *Ройтбак А. И.* —В кн.: Функции нейроглии (под ред. А. И. Ройтбака), с. 205—213, М, Наука, 1987.
21. *Соколова Н. Е., Таранова Н. П., Воронина Т. А., Неробкова Л. Н., Маркина Н. В.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 483—492, 1988.
22. *Лопатина Н. Г., Пономаренко В. В.* —В кн.: Физиология поведения: нейробиологические закономерности. Л., Наука. с. 9—59, 1987.

Поступила 28.IV.1989