



УДК 616.8.009.863+612.822+519.3±612.63

ВЛИЯНИЕ ДЕПРИВАЦИИ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС НА СВЯЗЫВАНИЕ [³H]ДИАЗЕПАМА С СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА ИХ ПОТОМСТВА

ЖУЛИН В. В., *ЗАБЛУДОВСКИЙ А. А.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР;
*Институт психиатрии МЗ РСФСР, Москва

Согласно клиническим наблюдениям, неврозы матерей во время беременности могут приводить к церебральным дисонтогенезам у детей—задержкам психического развития. В экспериментальных исследованиях для моделирования невротических реакций нередко применяют депривацию парадоксальной фазы сна (ПФС)—воздействие, вызывающее срыв высшей нервной деятельности.

Нами было показано, что у потомства крыс, перенесших депривацию ПФС во время беременности, изменены ориентировочные реакции в «открытом поле», значительно ухудшено сохранение рефлекса пассивного избегания, снижен порог чувствительности к электрическому току, повышена судорожная готовность.

По современным представлениям, бензодиазепиновая (БД) система мозга принимает участие в организации ряда функций ЦНС. В частности, показано, что бензодиазепины влияют на память, вызывая антероградную амнезию [1], изменяют структуру сна, в особенности его парадоксальную фазу [2], воздействуют на судорожную готовность [3].

Исходя из этого, в настоящей работе исследовали влияние депривации ПФС во время беременности на характеристики связывания [³H]дiazепама с синаптическими мембранами мозга потомства крыс.

Материалы и методы

Самок белых крыс в период с 14 по 20 дни беременности содержали в стеклянных резервуарах на небольших площадках, окруженных водой. Контрольные животные находились в обычных клетках. В обеих группах были синхронизированы периоды кормления. После рождения крыс пометы были выравнены по количеству животных.

По достижении 14-дневного (или двухмесячного) возраста в период между 10—12 ч дня самцов обеих групп декапитировали, извлекали кору больших полушарий и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера

с тefлоновым пестиком (25—30 фрикций) в 20 объемах (по весу ткани) среды выделения (0,32 М сахараза, 0,05 М трис-НСI, рН 7,4 и 0,001 М ЭДТА). Гсмогенат центрифугировали при 1000 g 10 мин, осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали при 20000 g 20 мин. Осадок Р₂ суспендировали в 20 мл 0,05 М трис-НСI, рН 7,4 и замораживали на ночь при —10°. На следующий день осаждали материал центрифугированием при 20000 g 20 мин и еще раз отмывали осадок 0,05 М трис-НСI, рН 7,4 при тех же условиях. Полученную грубую фракцию синаптических мембран Р₂ ресуспендировали в 15 мл 0,05 М трис-НСI, рН 7,4. На всех стадиях выделения поддерживали температуру —4°.

Реакцию связывания [³H]диазепама с БД-рецепторами начинали добавлением 0,4 мл суспензии мембран к 0,1 мл водного раствора [³H]диазепама (90 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) и останавливали через 30 мин фильтрованием образца через фильтр GF/B и тремя промывками по 2 мл 0,05 М трис-НСI, рН 7,4 (выбрано 10 точек в интервале концентраций 0,3÷30 нМ; каждая точка взята в трех параллелях; время фильтрования одного образца составляло 10 с). Инкубацию проводили при температуре 1—2°. Высушенные фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы с 8 мл жидкого сцинтиллятора ЖС-8 («Реаким», СССР) и просчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Rack Beta» («LKB», Швеция). Для учета неспецифического связывания изучали зависимость связывания [³H]диазепама с фракцией синаптических мембран Р₂ в присутствии 0,4·10⁻⁶ М немеченого 7-бром-десметилдиазепама [4]. Для концентрации 0,3 нМ меченого диазепама неспецифическое связывание не превышало 8%, а для концентрации 30 нМ—30% от общего связывания. В каждом эксперименте контролировали наклон прямой неспецифического связывания по нескольким точкам, а также вводили поправку на содержание белка. Затем вычисляли специфическое связывание как разность общего связывания и неспецифического, определенного из наклона соответствующей ему прямой (данный метод определения неспецифического связывания в условиях стандартизированных процедур выделения и связывания дает меньшую погрешность, чем традиционный). Концентрация белка, определенная по методу Lowry и соавт. [5], варьировала в пределах 0,2—0,4 мг/пробу.

В подопытной и контрольной группах было по 6 животных. Данные по связыванию усредняли и откладывали в координатах Скэтчарда. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

В большинстве работ по связыванию бензодиазепинов с синаптическими мембранами мозга график Скэтчарда имеет линейный характер. Вместе с тем, для построения графика часто рассчитывают линейную регрессию по 4÷6 точкам [6—8], иногда пренебрегая параметрами связывания в области малых концентраций лиганда [9], что в совокупности может иметь принципиальное значение для определения формы графика. Поэтому для построения графика Скэтчарда мы взяли 10 точек по различным концентрациям меченого диазепама, причем половину из них— в области малых концентраций (0,3÷2,0 нМ).

Результаты и обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что для двухмесячных животных, в отличие от двухнедельных, графики Скэтчарда носят нелинейный характер. Для анализа последних представлялось целесообразным воспользоваться моделью двух независимых участков связывания, поскольку этот метод дает возможность определить количественное соотношение и аффинности популяций независимо от того, являются ли они химически неоднородными рецепторами или различными конформационными формами рецептора одного типа. Разложение экспериментальных кривых в соответствии с моделью двух независимых участков связывания проводили по методу Кантор, Шиммель [10].

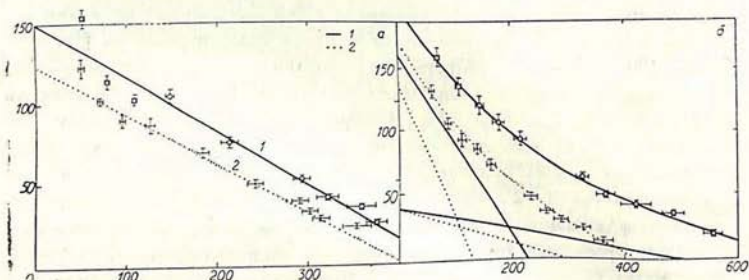


Рис. Графики Скэтчарда для связывания $[^3\text{H}]$ диазепама с синаптическими мембранами мозга крыс в возрасте 14 дней (а) и 2 месяцев (б), матери которых подвергались депривации ПФС во время беременности. 1—контроль, 2—опыт. По оси абсцисс—специфическое связывание (фмоль/мг белка), по оси ординат—
$$\frac{\text{несвязанная метка}}{\left(\frac{i \text{ фмоль}}{\text{мг белка} \cdot \text{нМ}} \right)}$$

Общий уровень связывания $[^3\text{H}]$ диазепама с синаптическими мембранами (рис. а, б) контрольных крыс увеличивается с возрастом животных (для двухнедельных— $442,2 \pm 18,7$ фмоль/мг белка, двухмесячных— $722,0 \pm 28,9$ фмоль/мг белка, $p < 0,01$), что совпадает с данными, имеющимися в литературе [11]. Однако у 14-дневных крыс обнаружена одна популяция, а у двухмесячных—две популяции БД-рецепторов, что может свидетельствовать о неполной дифференциации рецепторов в раннем онтогенезе. В группе подопытных животных общий уровень связывания с возрастом практически не изменился (две недели— $406,7 \pm 15,9$ фмоль/мг белка; 2 месяца— $422,0 \pm 19,9$ фмоль/мг белка).

Лишение ПФС во время беременности привело у двухнедельного потомства к небольшому снижению сродства (K_d) и доступных мест связывания (B_{max}) по сравнению с контролем (контроль: $K_d = 2,96 \pm 0,09$ нМ, $B_{\text{max}} = 442,2 \pm 18,7$ фмоль/мг белка; опыт: $K_d = 3,30 \pm 0,11$ нМ*, $B_{\text{max}} = 406,7 \pm 15,9$ фмоль/мг белка, * $p < 0,05$). В группе двухмесячных животных снижение общего связывания составило 42% (контроль— $722,0 \pm 28,9$ фмоль/мг белка; опыт— $422,0 \pm 19,9^*$ фмоль/мг белка, * $p < 0,01$), что было обусловлено комплексным изменением параметров связывания в обеих популяциях БД-рецепторов (таблица). Связывание

с низкоаффинной популяцией снизилось преимущественно за счет уменьшения аффинности рецепторов, тогда как для высокоаффинной популяции, в основном, за счет снижения числа мест связывания (удельный вес каждой популяции не изменился: высокоаффинная—31%, низкоаффинная—69%).

Функция БД-рецепторов тесно связана со сном. С одной стороны, известен выраженный снотворный эффект этой группы лекарств, опосредуемый БД-рецепторами, а с другой—показано, что в зависимости от времени суток и состояния организма (бодрствование—сон) изменяется плотность БД-рецепторов [12]. Сходная ситуация (опосредование действия лекарств и изменение в ответ на физиологические нагрузки) обнаруживается и при исследовании БД-рецепторов потомства животных, перенесших фармакологическое или физиологическое воздействие во время беременности. Так, пренатальное воздействие хлордиазепоксида привело у крыс к достоверному снижению связывания [^3H]флунизтазема с мембранами неокортекса [13]. Значительное снижение связывания [^3H]флунизтазема выявлено у потомства крыс, подвергавшихся стрессу во время беременности [14]. Хорошо видно, что эти данные сходны с результатами, полученными нами при изучении влияния на потомство депривации ПФС и других сопровождающих ее патогенных факторов (стресс, ограничение подвижности).

Таблица

Влияние депривации парадоксальной фазы сна во время беременности на параметры связывания [^3H]диазепама с синаптическими мембранами неокортекса потомства крыс в возрасте двух месяцев ($n=6$)

Количество животных	Высокоаффинная популяция		Низкоаффинная популяция	
	K_d , нМ	V_{max} , $\frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка}}$	K_d , нМ	V_{max} , $\frac{\text{фмоль}}{\text{мг белка}}$
Контроль	$1,42 \pm 0,06$	$225,8 \pm 9,1$	$12,35 \pm 0,54$	$496,2 \pm 19,9$
Опыт	$0,96 \pm 0,04^*$	$130,0 \pm 6,1^*$	$7,58 \pm 0,30^*$	$292,0 \pm 13,8^*$

Примечание. $*p < 0,01$, n —количество опытов.

Могут ли эти явления иметь общий механизм? Как известно, бензодиазепины, модулируя ГАМК-ергическую систему, оказывают успокаивающее и снотворное действие. Поэтому не исключено, что депривация ПФС, связанный с ней стресс в качестве компенсаторной реакции вызывают в мозгу усиленную секрецию эндогенного нейромедиатора. Последнее, в свою очередь, равно как и хроническое применение бензодиазепинов, может стать причиной снижения доступных мест связывания (феномен десенситизации). Принципиальная возможность вышеизложенного механизма подтверждается, с одной стороны, данными о том, что бензодиазепины являются агонистами, а не антагонистами БД-рецепторов [15] и, с другой—сведениями о выделении с помощью метода моноклональных антител вещества с близкими к бензодиазепинам свойст-

вами [16]. Описанная схема может реализоваться в системе мать-плод, так как показано, что патологические изменения в результате пренатального воздействия диазепама устраняются при параллельном применении конкурентного антагониста бензодиазепинов—Ro15-1788 [17]. Следовательно, диазепам воздействует на плод, взаимодействуя с рецепторами «центрального» типа мозга матери.

В заключение следует отметить, что диазепам является неселективным лигандом БД-рецепторов: он связывается с рецепторами и «центрального», и «периферического» типов. Последние не опосредуют фармакологических эффектов бензодиазепинов, а их плотность в мозгу приблизительно в 4 раза ниже, чем плотность рецепторов «центрального» типа [18]. Представляется маловероятным, что рецепторы «периферического» типа вносят какой-либо значимый вклад в общую перестройку всей популяции БД-рецепторов мозга крыс, матери которых подвергались депривации ПФС во время беременности.

EFFECT OF RAPID EYE MOVEMENT SLEEP DEPRIVATION DURING PREGNANCY ON [³H]-DIAZEPAM BINDING TO SYNAPTOSOMAL MEMBRANES OF RAT NEOCORTEX ON THE DIFFERENT STAGES OF POSTNATAL DEVELOPMENT

ZHULIN V. V., *ZABLUDOVSKY A. L.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology Academy of Science of the USSR, Moscow

*Psychiatry Research Institute, Ministry of Public Health of the RSFSR Moscow

Rapid eye movement sleep deprivation during pregnancy results in alteration of ³H-diazepam binding to the synaptosomal neocortex membranes from rat offsprings. Binding level diminished for 9% in 14-day old males. In two months old animals Scatchard plots were not straight lines, because the analysis of experimental curves was carried out in accordance with the model of two independent binding sites. It has been shown that prenatal treatment leads to significant decrease (42%) of the total level of binding caused by complex changes in the high- and low-affinity populations of the benzodiazepine receptors. Possible modes of brain benzodiazepine system disturbance are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bixler E. O., Scharf M. B., Soldatos C. R., Mitsky D. J., Kales A. *Life Sci.*, v. 25, p. 1379—1388, 1979.
2. Воронина Т. А., Неробкова А.Н. *Фармакология и токсикология*, т. XLIV, с. 18—20, 1980.
3. Paul S. M., Syapin P. J., Paugh B. A., Moncada V., Scolnick P. *Nature*, v. 281, p. 688—689, 1979.
4. Андронати С. А., Чепелов В.М., Якубовская Л. Н., Вальдман А. В., Рожанец В. В., Жудин В. В., Коротков К. О. *Биооргани. химия*, т. 9, с. 1357—1361, 1983.

5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
6. Tallman J. F., Thomas J. W., Gallager D. W. *Nature*, v. 274, p. 383-385, 1978.
7. Braestrup C., Albrechtsen R., Squires R. F. *Nature*, v. 269, p. 702-704, 1977.
8. Guidotti A., Toffano G., Costa E. *Nature*, v. 275, p. 553-555, 1978.
9. Marangos P. J., Patel J. *Life Sci.*, v. 29, p. 1705-1714, 1981.
10. Кантор Ч., Шиммель П. *Биофизическая химия*, т. 3, с. 13-14, М., Мир, 1985.
11. Candy J. M., Martin I. L. *J. Neurochem.*, v. 32, p. 655-658, 1979.
12. Brennan M. J. W., Volicer L., Moore-Edo M. C., Borsook D. *Life Sci.*, v. 36 p. 2333-2337, 1985.
13. Gaviš M., Avnimelech-Gigus N., Feldon J., Myslobodsky M. *Life Sci.*, v. 36, p. 1693-1698, 1985.
14. Fride E., Dan Y., Gaviš M., Veinstock M. *Life Sci.*, v. 36, p. 2103-2109, 1985.
15. Concas A., Salis M., Biggio G. *Life Sci.*, v. 32, p. 1175-1182, 1983.
16. Sangameswaran L., de Blas A. L. *PNAS USA*, v. 82, p. 5560-5564, 1985.
17. Simmons R. D., Miller M. K., Kellog C. K. *Brain Res.*, v. 307, p. 39-46, 1984.
18. Marangos P. J., Patel J., Boulenger J.-P., Clark-Rosenberg R. *Mol. Pharma col.*, v. 22, p. 26-32, 1982.

Поступила 4. I. 1988