



УДК 612.06+612.7

ДИНАМИКА ИНДУЦИРОВАННОГО ПЕРЕКИСНОГО
ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В СИНАПТОСОМАХ КОРЫ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ НАРУШЕНИИ СНА

ТАРАНОВА Н. П., НИЛОВА Н. С.

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

Исследование биохимических характеристик синапсом из головного мозга крыс, лишенных парадоксальной фазы сна (ПФС), показало, что нарушение сна приводит к структурным перестройкам синаптических мембран, что не может не отразиться на их функциях [1—4]. Одним из механизмов, ответственных за развитие конформационных изменений клеточных мембран, могут быть процессы ПОЛ, являющиеся естественными способами модификации мембран [5, 6]. В опытах *in vivo*, проведенных ранее, нами было показано угнетение процессов ПОЛ в синапсом, выделенных из коры головного мозга крыс при лишении их ПФС в течение 24 ч [7]. Для того, чтобы выяснить, является ли уменьшение содержания продуктов ПОЛ следствием торможения реакций свободно-радикального окисления или результатом активации антиоксидантной системы, в настоящей работе была исследована динамика индуцированного *in vitro* ПОЛ синапсом.

Механизмы инициации процессов ПОЛ *in vivo* и *in vitro* одинаковы: при взаимодействии металлов переменной валентности (в первую очередь железа) с молекулярным кислородом возникают активные формы кислорода (супероксидный анион-радикал и гидроксильный радикал), окисляющие остатки жирных кислот молекул мембранных липидов [6]. В тканях железо может находиться в свободном состоянии или входить в состав специфических ферментов. В первом случае в присутствии каких-либо восстановителей (например, аскорбата) индуцируется процесс неферментативного ПОЛ; во втором случае в присутствии таких кофакторов, как NADPH или NADH индуцируется процесс ферментативного ПОЛ. Несмотря на то, что физиологическое значение процессов неферментативного ПОЛ *in vivo* оспаривается [8], полная характеристика потенциальных возможностей системы ПОЛ *in vitro* возможна только при исследовании индукции как неферментативного, так и ферментативного процессов ПОЛ.

Опыты ставили на белых крысах-самцах линии Wistar массой 160—180 г. Лишение ПФС проводили по методу Jouvet и соавт. [9]. Фракцию синапсом получали методом низкоскоростного центрифугирования [10] и промывали модифицированным раствором Кребса-Рингера следующего состава: NaCl—124 мМ, KCl—5 мМ, MgSO₄—1.3 мМ, трис-30 мМ (pH 7.4). Осадок синапсом суспендировали в той же среде и использовали для исследования индуцированного ПОЛ. Содержание белка в пробах для исследования ферментативного ПОЛ составляло 0,6 мг, неферментативного ПОЛ—1,3 мг. Белок определяли по методу Miller [11]. Динамику индуцированного ПОЛ изучали по методу Аристарховой и соавт. [12]. Принцип метода состоит в том, что в опытах *in vitro* вызывают ускорение процесса ПОЛ в биологических мембранах путем прибавления соответствующих индукторов и после различных сроков инкубации проб в термостатированной бане при покачивании определяют содержание продуктов ПОЛ, возникающих в результате индукции. В настоящих опытах инкубацию проб проводили в аппарате Варбурга при 37°. Пробу, содержащую модифицированный раствор Кребса-Рингера и суспензию синапсом (0,8 мл), преинкубировали в течение 5 мин для выравнивания температуры, затем из бокового отростка сосуда Варбурга прибавляли индукторы ПОЛ. Для неферментативного ПОЛ прибавляли 0,2 мл раствора Fe²⁺ и аскорбата (конечная концентрация Fe²⁺—10 мкМ, аскорбата—0,5 мМ). Для индукции ферментативного ПОЛ прибавляли 0,2 мл NADH или NADPH в конечной концентрации 0,5 мМ. Пробу инкубировали 5, 10, 15 и 20 мин. Реакцию останавливали добавлением ТХУ в конечной концентрации 18%.

Содержание одного из продуктов ПОЛ—малонового диальдегида (МДА)—определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [5]. Для определения прироста уровня МДА в ходе индукции ПОЛ ставили контроль на содержание этого продукта для нулевой отметки времени сразу по окончании преинкубации до прибавления индукторов ПОЛ.

Результаты исследования динамики индуцированного ПОЛ в синапсоммах, выделенных из коры головного мозга крыс в норме и при нарушении сна, приведены в таблице. Из полученных данных следует, что во всех сериях опытов в синапсоммах контрольных животных динамика индуцированного ПОЛ, как ферментативного, так и неферментативного, примерно одинакова. Скорость накопления МДА наиболее высока в первые 5 мин инкубации, а затем она замедляется и в следующие два 5-минутных интервала составляет 40—50% от исходной скорости. В более поздние сроки инкубации (20 мин) активность всех трех систем индуцированного ПОЛ снижается еще быстрее, однако количественный прирост МДА как в контроле, так и в опыте в ходе ферментативного ПОЛ значительно ниже, чем в случае неферментативного индуцированного процесса. Эта общая закономерность зарегистрирована и для других тканей [12]. Причиной этого является то обстоятельство, что неферментативное ПОЛ могут подвергаться все ненасыщенные жирные кислоты мембранных липидов, в том числе и моноеновые. Ферментативной пероксидации под

Таблица

Динамика индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ) в синаптосомах коры головного мозга крыс при лишении их парадоксальной фазы сна (ПФС) в течение 24 ч

Индуктор ПОЛ	Прирост малонового диальдегида, нм/мг белка							
	5 мин		10 мин		15 мин		20 мин	
	Контроль	Лишение ПФС	Контроль	Лишение ПФС	Контроль	Лишение ПФС	Контроль	Лишение ПФС
Аскорбат + Fe^{2+}	$2,80 \pm 0,27$ (13)	$2,90 \pm 0,42$ (13)	$4,10 \pm 0,44$ (12)	$4,50 \pm 0,54$ (13)	$5,60 \pm 0,50$ (12)	$6,10 \pm 0,67$ (12)	$5,20 \pm 0,63$ (10)	$6,80 \pm 0,69$ (10)
NADH	$0,80 \pm 0,07$ (14)	$0,80 \pm 0,07$ (14)	$1,10 \pm 0,07$ (14)	$1,30 \pm 0,09$ (14)	$1,40 \pm 0,09$ (14)	$1,50 \pm 0,07$ (14)	$1,60 \pm 0,08$ (13)	$2,10 \pm 0,18^*$ (14)
NADPH	$0,70 \pm 0,03$ (13)	$0,70 \pm 0,06$ (14)	$1,10 \pm 0,10$ (14)	$1,10 \pm 0,07$ (14)	$1,40 \pm 0,07$ (13)	$1,40 \pm 0,07$ (14)	$1,60 \pm 0,10$ (14)	$1,80 \pm 0,13$ (14)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем. В скобках—число опытов.

вергаются в основном полиеновые кислоты. Кроме того, неферментативное ПОЛ возможно в любом локусе мембраны, а ферменты, осуществляющие ПОЛ в клетке (диоксигеназы и липоксигеназы), имеют строго определенную локализацию вблизи электронпереносящих цепей митохондрий (NADH-зависимые ферменты) или эндоплазматического ретикулаума (NADPH-зависимые ферменты). Из полученных данных следует также, что интенсивность ферментативного ПОЛ, индуцируемого NADH и NADPH, в синапсосах примерно одинакова. По всей видимости, и в синапсосах местом локализации NADH-зависимого ПОЛ являются митохондрии, а NADPH-зависимый ферментативный процесс ПОЛ происходит в той части эндоплазматического ретикулаума, которая может проникать в пресинаптическую область [13].

Сравнение прироста МДА при индукции ПОЛ в синапсосах из коры больших полушарий головного мозга контрольных и лишенных ПФС крыс не выявило угнетения индуцированного ПОЛ при нарушении сна. Более того, неферментативный аскорбатзависимый процесс в синапсосах головного мозга животных, лишенных ПФС, имеет тенденцию к активации, особенно в последние сроки инкубации. Ферментативный NADH-зависимый процесс ПОЛ также более активен в синапсосах при лишении крыс ПФС. Прирост МДА в данном случае в ходе инкубации более интенсивен в опыте, чем в контроле, и к концу инкубации разница достигает 30% по отношению к контролю (таблица).

Таким образом, результат настоящего исследования позволяет заключить, что потенциальные возможности системы ПОЛ в синапсосах при нарушении сна не страдают. По-видимому, это означает, что причиной установленного ранее ингибирования ПОЛ *in vivo* при лишении ПФС является рост антиоксидантной активности синапсосом. Подтверждением этому является активация супероксиддисмутазы в синапсосах коры больших полушарий при лишении крыс ПФС [7]. Причиной несоответствия направлений сдвигов в процессах ПОЛ *in vivo* и *in vitro* может быть изменение условий функционирования системы антиоксидантной защиты. Аналогичные результаты получены при исследовании NADPH-зависимого ПОЛ в микросомах печени [14].

DYNAMICS OF THE INDUCED LIPID PEROXIDATION IN RAT BRAIN CORTEX SYNAPTOSOMES AFTER SLEEP DISTURBANCE.

TARANOVA N. P., NILOVA N. S.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Acad. Sci., Leningrad

The influence of paradoxical sleep deprivation on free radical lipid peroxidation in rat brain cortex synaptosomes has been studied *in vitro*. This sleep disturbance did not inhibit either ascorbate or NADP-H-dependent lipid peroxidation, but activated NADH-dependent one.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демин Н. Н. Нейрохимия, т. 1, с. 20—27, 1982.
2. Нилюва Н. С. Нейрохимия, т. 2, с. 307—314, 1983.
3. Нилюва Н. С. Нейрохимия, т. 3, с. 347—352, 1984.
4. Нилюва Н. С. Цитология, т. 26, с. 1396—1400, 1984.
5. Влаллимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., Наука, 1972.
6. Мил Д.—В кн.: Свободные радикалы в биологии (под ред. У. Прайор), с. 68—87, М., Мир, 1979.
7. Таранова Н. П., Нилюва Н. С. Физиол. журн. СССР, т. 72, с. 1065—1068, 1986.
8. Ланкин В. З.—В кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ (под ред. С.Е. Северина), с. 75—95, М., Наука, 1981.
9. Jouvett D., Vimont P., Delorme F., Jouvett M. Compt. rend. Soc. biol., v. 158, p. 756—659, 1964.
10. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
11. Miller G. L. Anal. Chem., v. 31, p. 964, 1959.
12. Аристархова С. А., Бурлакова Е. Б., Засец Т. А. Вспр. мед. химии т. 29, № 4, с. 102—105, 1983.
13. Droz B., Rambourg A., Koenig H. K. Brain Res., v. 93, p. 1—13, 1975.
14. Кухтина Е. Н., Глущенко Н. Н., Федоров Ю. Н. Биохимия, т. 49, с. 1510—1514, 1984.

Поступила 11. II 1988