



СОРБЦИЯ КРАСИТЕЛЕЙ СИНАПТОСОМАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ЛИШЕНИИ ИХ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА

НИЛОВА Н. С.

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

Исследовали сорбцию основного красителя—нейтрального красного и кислых красителей—бирюзового прямого светопрочного и бромтимолового синего синаптосомами коры больших полушарий и стволовой части головного мозга крыс. Выявлено различное для коры и ствола изменение связывания этих красителей при лишении парадоксальной фазы сна: в препаратах синапсом коры число мест связывания нейтрального красного уменьшалось на 41, бирюзового прямого светопрочного—на 22%. число мест связывания бромтимолового синего увеличивалось на 35%. В синаптосомах ствола нарушение сна не приводило к каким-либо сдвигам в сорбции нейтрального красного и бирюзового прямого светопрочного; число мест связывания бромтимолового синего увеличивалось на 106%.

Результаты исследований нейрохимических характеристик сна и его нарушений позволили предположить, что естественный сон, в частности в метаболическом отношении, необходим для ликвидации постепенно развивающихся при бодрствовании изменений конформации некоторых мембранных структур головного мозга [1, 2]. Особый интерес вызывают в этой связи синаптические мембраны, так как их состояние определяет эффективность синаптической передачи и уровень возбудимости нервной ткани. Однако данные, характеризующие свойства синаптических мембран при нарушениях сна, до сих пор еще косвенны и немногочисленны [2]; необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

Одной из характеристик структурной организации клеточных мембран и распределения в них химически активных групп является способность связывать различные красители. Взаимодействие липопротеидных комплексов мембран с красителями может давать информацию о стабильности или динамике конформации полипептидных цепей. В частности, титрование заряженных групп мембран аннионами и катионами позволяет оценить как суммарный заряд мембран, так и соотношение разных по значению фиксированных зарядов в мембране [3].

В связи с этим было целесообразно исследовать сорбцию различных по строению анионных и катионных красителей синапсосомами разных отделов головного мозга при нарушении сна. В настоящей работе изучали связывание анионных красителей—бирюзового прямого светопрочного (БП) и бромтимолового синего (БТС), а также катионного красителя—нейтрального красного (НК)—синапсосомами коры больших полушарий и ствола головного мозга крыс, лишенных парадоксальной фазы сна (ПФС) в течение 24 ч.

Материалы и методы

Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 160—180 г. Лишения ПФС достигали помещением животных на небольшие площадки над водой [4]; контролем служили крысы, которых содержали в обычных клетках.

Синапсосомы получали методом низкоскоростного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [5]. Содержание синапсосомного белка определяли по Lowry и соавт. [6].

Сорбционные свойства синапсосом исследовали по методу Левина и соавт. [7, 8]. Пробу с красителем инкубировали 1 ч при 30°, затем синапсосомы осаждали центрифугированием. В надосадочной жидкости определяли концентрацию красителя, соответствующую равновесной концентрации несвязанного мембранами красителя. Применяли следующие условия инкубации проб: *нейтральный красный*—исходная концентрация красителя $0,3-0,5 \times 10^{-5}$ М, содержание белка в пробах—120—170 мкг, общий объем проб—6 мл, фотометрия проб при 520 нм и толщине кюветы 3 см; *бирюзовый прямой светопрочный*—исходная концентрация красителя $0,3-0,6 \times 10^{-5}$ М, содержание белка в пробах—60—80 мкг, общий объем проб—2 мл, фотометрия при 620 нм, толщина кюветы—1 см; *бромтимоловый синий*—исходная концентрация красителя $0,9-1,2 \times 10^{-5}$ М, содержание белка в пробах—60—80 мкг, общий объем проб—2 мл, фотометрия при 400 нм и толщине кюветы—1 см.

Результаты и обсуждение

Опыты показали, что лишение ПФС приводило в синапсосомах к изменению числа мест связывания красителей, при этом характер изменения сорбционных свойств синапсосом из коры и ствола был несколько различным (таблица). В синапсосомах коры число мест связывания НК уменьшалось на 41%; сорбция БП и БТС изменялась в противоположных направлениях: число мест связывания БП уменьшалось на 22%, а число мест связывания БТС возрастало на 35%. В синапсосомах ствола головного мозга крыс, подвергнутых лишению ПФС, число мест связывания НК проявляло лишь некоторую тенденцию к снижению (уменьшение на 16% было недостоверно), сорбция БП не изменялась, а число мест связывания БТС возрастало в 2 раза.

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что при лишении ПФС может нарушаться пространственная конфигурация синаптических мембран. Уменьшение числа мест связывания НК, особенно четко выраженное у синапсом коры, указывает на перезарядку мембран вследствие уменьшения общего отрицательного заряда синаптических мембран. При рН, близком к 7,0, молекула НК находится в форме катиона и взаимодействует с мембранами, в основном, электростатически, связываясь с карбоксильными и фосфатными группами белков и липидов, находящихся в определенном гидрофобном окружении. Весьма вероятно, что этот катионный краситель титрует в основном отрицательные группы белков, располагающиеся вблизи липидов [3].

Таблица

Число мест связывания некоторых красителей синапсами головного мозга крыс при лишении их парадоксальной фазы сна

Краситель	Предельное количество красителя (в молях), связанного 1кг белка нервных окончаний $\times 10^2$	
	Контроль	Лишение парадоксальной фазы сна в течение 24 ч

Кора больших полушарий

Нейтральный красный	13,8	8,1
Бирюзовый прямой светопрочный	6,5	5,1
Бромтимоловый синий	8,7	11,8

Стволовая часть головного мозга

Нейтральный красный	9,9	8,3*
Бирюзовый прямой светопрочный	4,2	4,1*
Бромтимоловый синий	4,7	9,7

Примечание. *статистически недостоверное отклонение

Эти данные интересно сопоставить с ранее полученными нами результатами опытов, в которых было установлено уменьшение сорбции синапсами головного мозга другого катионного красителя — рутениевого красного при лишении крыс ПФС [9].

Как и все катионы, этот краситель связывается мембранами в основном электростатически и титрует кислые группы гликолипидов и гликопротеидов. Уменьшение числа мест связывания рутениевого красного также может свидетельствовать об уменьшении общего отрицательного заряда синаптических мембран при нарушении сна, воз-

можно, вследствие изменения ориентации некоторых цепей гликолипидов и гликопротеинов.

Конформационные изменения синаптических мембран, происшедшие при лишении животных ПФС, могли касаться также и гидрофобных взаимодействий между различными белками или между белками и липидами. Обращает на себя внимание значительное увеличение числа мест связывания анионного красителя БТС, которое наблюдали в синаптических мембранах коры и ствола при нарушении сна. Анионные красители связываются на мембранах не только (и не столько) с положительными (вероятно, аминными) группами белков, но также и за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий: более 50% красителя может связываться именно последними двумя способами [3]. Особенно важны гидрофобные связи при сорбции БТС, обладающего максимальной липофильностью среди всех представителей группы сульфоталениновых красителей. Вследствие высокой гидрофобности БТС может взаимодействовать с белками на уровне их связей с липидами. Поэтому значительное увеличение сорбции БТС, которое было установлено при нарушении сна, может свидетельствовать также об изменении некоторых белков и липидов (ослаблении белок-липидных взаимодействий в этих условиях). Возможность такого рода изменений взаимосвязи белков и липидов в синаптических мембранах была показана при изменении функциональной нагрузки синапсом—их электростимуляции [10].

Изменения гидрофобных взаимодействий в молекулах мембранных белков и взаимодействия белков и липидов могут иметь значение для ионной проницаемости мембран и медиаторных процессов, так как, согласно современным представлениям, плотность упаковки белковых и липидных молекул, степень гидратированности и степень жесткости мембранных структур имеют большое значение для работы ионных каналов и характеристики ионных потоков через мембрану [3, 11, 12].

Результаты опытов по сорбции другого анионного красителя—БП—также подтверждают вероятность того, что при нарушении сна перестройка синаптических мембран носит сложный характер и не состоит в простой перезарядке. Из полученных данных следует, что в отличие от БТС число мест связывания этого анионного красителя в коре уменьшалось, а в стволе не изменялось. Как и все анионные красители, БП связывается в мембране ионными, гидрофобными и водородными связями. Но в отличие от БТС этот краситель не взаимодействует с липидами и не способен проникать через мембраны, так как он сорбируется исключительно белками, расположенными на их поверхности. Для сорбции БП экранирование положительно заряженных групп белков может иметь иногда решающее значение. Показано, например, что именно экранирование небольшого числа аминных групп белков мембраны, связанное с работой натриевых кана-

лов, могло быть причиной десорбции БП при ритмическом раздражении нерва краба [3]. Возможно, что и в условиях наших опытов изменение работы синапсов при нарушении сна приводило к пересорбции некоторых положительных зарядов белков, необходимых для сорбции БП, что и могло быть причиной уменьшения сорбции красителя.

Таким образом, изменение сорбции анионных и катионных красителей может отражать структурные перестройки синаптических мембран, развивающиеся при лишении ПФС. Следует отметить, что эти результаты подтверждают полученные ранее данные о модификации (сдвигов в сторону денатурации) структурных белков при нарушении сна на примере изменения количества сульфгидрильных групп мембран клеток ствола головного мозга крыс [13].

Функциональное значение перестроек мембран при лишении ПФС может состоять в изменении эффективности синаптической передачи в этих условиях. Возможно, что в основе явлений, приводящих к изменению эффективности работы синапсов, лежат минорные альтерации синаптических мембран, составляющими компонентами которых могут быть перераспределение зарядов на мембранах и степень гидрофобных взаимодействий белково-липидных комплексов. Можно предположить, что в нервных окончаниях коры при нарушении сна наиболее выражена перезарядка мембран, а в нервных окончаниях ствола—изменение степени гидрофобности отдельных участков мембраны.

SORPTION OF DYES BY RAT BRAIN SYNAPTOSOMES WITH RAPID EYE MOVEMENT SLEEP DEPRIVATION

NILOVA N. S.

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

Differences in the mode of binding of cation and anion dyes by synaptosomes from cerebral cortex and brain stem under condition of rapid eye movement sleep deprivation have been demonstrated. In the case of cerebral cortex the number of binding sites of neutral red decreased for 41% and that of heliogen blue—for 22%; the number of binding sites of bromthymol blue increased for 35%. In the synaptosomes from brain stem the sorption of neutral red and heliogen blue did not change, the number of binding sites of bromthymol blue increased for 106%.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Демин Н. Н., Коган А. Б., Моисеева Н. Н. Нейрофизиология и нейрохимия сна, Л., Наука, 1978.
2. Демин Н. Н. Нейрохимия, 1. 1. 20—27, 1982.
3. Левин С. В. Структурные изменения клеточных мембран, Л., Наука, 1976.

4. Jouvét D., Vimont P., Delorme F., Jouvét M. C. R. Soc. Biol., 158, 756—759, 1964.
5. Hajós F. Brain Res., 93, 484—489, 1975.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
7. Комиссарчик Я. Ю., Левин С. В., Пассова Р. Б. Цитология 13, 286—293, 1971.
8. Тугай В. А., Левин С. В., Курский М. Д. Цитология, 15, 1103—1109, 1973.
9. Нилова Н. С. Цитология, 22, 1081—1084, 1980.
10. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н., Маликова Л. А., Родина В. И., Рожанец В. В., Сандалов Ю. Г., Швец В. И. Биохимия, 41, 975—981, 1976.
11. Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран, М., Наука, 1982.
12. Kennedi S. J. J. Membrane Biol., 42, 265—279, 1978.
13. Демин Н. Н., Раишевская Д. А. Физиол. журн. СССР, 65, 23—28, 1979.

Поступила 15. I 1983

ШЕСТОЙ СЪЕЗД ЕВРОПЕЙСКОГО НЕЙРОХИМИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА—ПРАГА 1986 ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

В сентябре 1986 г. в Праге (ЧССР) намечается провести IV съезд Европейского нейрохимического общества, программа которого будет состоять из симпозиумов, рабочих заседаний, дискуссий за круглым столом, стендовых сообщений и пленарных докладов, посвященных всем разделам нейрохимии и молекулярной нейробиологии, включая нейрофармакологические и нейропатологические аспекты.

Дополнительная информация о съезде будет разослана секретариатом ВБО АН СССР и опубликована в нашем журнале.