

УДК 612.014.423+612.8.015

ФИЗИОЛОГИЯ

В. Я. БРОДСКИЙ, В. Н. ГУСАТИНСКИЙ, А. Б. КОГАН, Н. В. НЕЧАЕВА

**РАЗЛИЧИЯ В ИНТЕНСИВНОСТИ ВКЛЮЧЕНИЯ Н³-ЛЕЙЦИНА
В БЕЛКИ ПРИ МЕДЛЕННОВОЛНОВОЙ И ПАРАДОКСАЛЬНОЙ
ФАЗАХ ЕСТЕСТВЕННОГО СНА В АССОЦИАТИВНОЙ КОРЕ
МОЗГА КОШКИ**

(Представлено академиком М. Н. Ливановым 20 XII 1973)

В цитохимических исследованиях выяснена связь между функциональной активностью нервной ткани и метаболизмом РНК и белков в нейронах (¹⁻⁴). Обнаружение двух фаз сна — медленноволновой (м.с.) и парадоксальной (п.с.), различающихся по электрической активности мозга и другим показателям, позволило представить разную их значимость в процессах обмена макромолекул и, следовательно, в репаративном метаболизме нервной ткани. Действительно, было выяснено, что с увеличением доли п.с. усиливается синтез определенных фракций РНК в ткани мозга (⁵). Опыты с предотвращением п.с. обнаружили уменьшение содержания белка в нейронах супраоптического и красного ядер головного мозга крыс при депривации, сравнительно с полноценным сном и состоянием бодрствования (⁶). Депривация п.с. сопровождалась также резким возрастанием включения ряда аминокислот в белки мозга крыс (⁷).

Задачей нашей работы было изучение интенсивности синтеза белка в ткани мозга, выделенной непосредственно во время м.с. и п.с., а также в состоянии активного бодрствования. Биопсия мозга осуществлялась специальным устройством, позволяющим извлекать около 50 мг ткани мозга спящего животного, не пробуждая его, в определенную фазу сна. Изоляция ткани снимала влияние систем, которые в целом мозге осуществляют смену фаз сна. Поэтому метаболическое состояние участка мозга, выделенного во время п.с. или м.с., может считаться аналогом той или иной фазы сна.

За 6—7 дней до опыта у кошек под нембуталовым наркозом проводилась трепанация черепа в симметричных точках над теменными зонами мозга. После удаления твердой мозговой оболочки в отверстия черепа ввинчивали эбонитовые втулки с пробками, в которых были укреплены электроды для регистрации электрокортикограммы. В ходе операции устанавливались также электроды для записи электроокулограммы, электрической активности гиппокампа и электромиограммы шейных мышц. Через два дня после операции, когда общее состояние животных нормализовалось, их ежедневно помещали на 60—90 мин. в экспериментальную камеру для адаптации к условиям опыта. По истечении 6 дней после операции за 10 мин. до начала опыта на место пробки с электродами помещалось устройство для биопсии мозга. Принцип действия устройства заключался в мгновенном извлечении участка коры с помощью миниатюрного ковшика с зубчатыми краями, приводимого в действие пружиной. Получение ткани осуществлялось под электрофизиологическим контролем в заданную фазу сна. Биопсия мозга из другого полушария проводилась через сутки в состоянии активного бодрствования животного, когда э.к.о.г. в интактном полушарии не отличалась от исходной. Длительность м.с., предшествующая биопсии мозга, составляла 20 мин., п.с. 1,5 мин., состояния активного бодрствования 20 мин. Выделенные взвешенные кусочки мозга измельча-

лись и помещались на 45 мин. в среду 199 с H^3 -лейцином (доза 15 мкС/мл), содержащую 20% сыворотки крупного рогатого скота, а также 70 мкг витамина С и 4 мг глюкозы на 1 мл среды. После инкубации кусочки промывали холодной средой 199 с избытком немеченого лейцина, затем обрабатывали холодной 5% трихлоруксусной кислотой (ТХУ), гидролизовали 5% ТХУ при 90° в течение 15 мин. для удаления нуклеиновых кислот. Надосадочную жидкость сливали, осадок промывали 96° этанолом и эфиром. Впоследствии преципитат полностью растворяли гиамином, добавляли толуоловый сцинтиллятор и измеряли радиоактивность на сцинтилля-

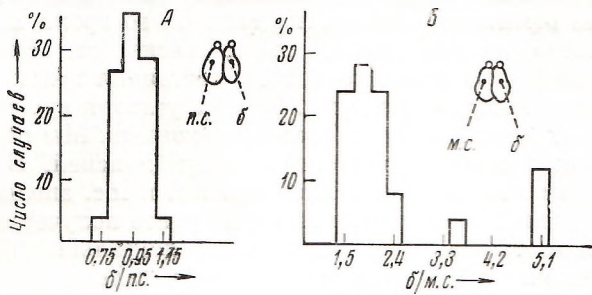


Рис. 1. Отношение интенсивностей включения H^3 -лейцина в белки теменной области коры в состоянии активного бодрствования кошек (б) к п.с. (А) и к м.с. (Б). В А общее количество животных 41, в Б — 25

ционном счетчике SL-30. Эффективность счета составляла 25%. Во всех опытах радиоактивность пересчитывали на 1 мг сырого веса ткани. Для того чтобы оценить воспроизводимость измерений, обе биопсии вначале осуществлялись в состоянии активного бодрствования с интервалом времени в одни сутки. Удельная радиоактивность H^3 -лейцина в белках ткани мозга составляла (в имп/мин на 1 мг сырого веса):

№ животного	1-я биопсия	2-я биопсия
1	417	399
2	313	366
3	471	451
4	361	388
5	316	334
6	437	471

Проведенный с помощью критерия Вилкоксона подсчет показал, что различия между имеющимися выборками не достоверны, а составляющие их варианты принадлежат к одной генеральной совокупности.

Во второй серии опытов мозг выделяли сначала в п.с. и повторно у того же животного через сутки в состоянии активного бодрствования. Удельная радиоактивность H^3 -лейцина в белках ткани мозга составляла (в имп/мин на 1 мг сырого веса):

Число животных	М.с.	П.с.	Бодрствование
25	190±14	—	373±19
41	—	450±12	426±10

Математическая обработка данных с помощью критерия Вилкоксона не выявила достоверных различий в уровне удельной радиоактивности между изученными аналогами функциональных состояний (рис. 1А).

В третьей серии экспериментов мозг выделяли в м.с. и вторично через сутки в состоянии активного бодрствования (рис. 1Б). Выяснилось, что уровни удельной радиоактивности в этих случаях достоверно различаются (критерий Вилкоксона). Также достоверно различаются величины удельной радиоактивности ткани мозга, взятой во время п.с. и м.с.

Таким образом, количественные данные (рис. 1) приводят к выводу, что п.с., предшествующий выделению ткани мозга и ее инкубации с меченой аминокислотой, увеличивает радиоактивность белков в 2 раза по сравнению с м.с. в тех же условиях существования ткани *in vitro*. В этом отношении влияние п.с. не отличается от бодрствования мозга. Измерение одной радиоактивности H^3 -лейцина в белках не дает строгого представления об интенсивности синтеза белка. Мы не знаем изменений внутриклеточного фонда аминокислот и проницаемости клетки для экзогенных предшественников. При п.с. и м.с. возможен также неодинаковый по интенсивности распад белков. Все же столь существенные различия радиоактивности белков, которые отмечены в ткани, выделенной во время п.с. и м.с., вряд ли совсем не соответствуют изменениям интенсивности синтеза белка в той или иной фазе сна. Функциональные состояния целой и изолированной ткани, по-видимому, отличаются. Однако условия существования ткани *in vitro* во всех наших опытах были одинаковыми. Мы оценивали влияние на метаболизм мозга его состояния перед биопсией. В этом смысле различия в общем метаболизме белков при п.с. и м.с. вполне ясны.

Результаты нашей работы соответствуют ранее полученным косвенным данным о высоком уровне метаболизма в парадоксальной фазе сна. Так, у высших позвоночных в период раннего постнатального развития, когда доля п.с. достигает 70% (⁸, ⁹), содержание РНК и белков в нейронах возрастает (¹⁰). В п.с. возрастает температура мозга, нередко превышая его температуру в состоянии бодрствования, увеличивается насыщение крови кислородом, сравнительно с м.с. растет местный кровоток (¹¹). Известные факты относительно ускорения синтеза белка при возрастании функциональной активности нервной ткани (², ⁴) коррелируют с электрофизиологическими данными о возрастании частоты импульсации у большинства нейронов коры мозга в п.с. относительно м.с. (¹², ¹³).

Полученные нами и литературные данные (⁵, ⁶, ¹⁰, ¹¹) свидетельствуют о том, что в п.с. кора мозга находится в активном состоянии, во многом сходном с состоянием бодрствования. В то же время очевидно, что между этими состояниями имеются и значительные различия, которые, возможно, заключаются в несовпадении уровней белкового распада. По-видимому, большая часть дефицита пластического материала во время сна ликвидируется посредством ускоренного синтеза белка в п.с., так как его продолжительность у высших млекопитающих достигает 20–30% общей продолжительности сна (¹⁴). Не следует, однако, исключать возможность репарации нервной ткани и в период общего понижения электрической активности во время м.с. У целого ряда животных п.с. вообще отсутствует.

Сопоставление уровней белкового синтеза и распада на разных фазах сна и в состоянии активного бодрствования может дать новые сведения о физиологическом значении каждой фазы сна.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
20 XII 1973

Ростовский государственный университет
Ростов-на-Дону

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Х. Хиден, Нейрон, В сборн. Функциональная морфология клетки, ИЛ, 1963, стр. 185.
- ² В. Я. Бродский, Трофика клетки, «Наука», 1966.
- ³ Л. З. Певзнер, Функциональная биохимия нейроглии, «Наука», 1972.
- ⁴ Ю. М. Гейнисман, В. Н. Ларина, В. М. Мац, Цитология, т. 12, № 8, 1029 (1970).
- ⁵ A. Vitale-Neugebauer, A. Giuditta, J. Neurochem., v. 17, 8, 263 (1970).
- ⁶ Г. Ш. Воронка, Н. Н. Демин, Л. З. Певзнер, ДАН, т. 198, № 4, 974 (1971).
- ⁷ P. Bobillier, F. Sakai, Life Sci., v. 10, 1349, 223 (1971).
- ⁸ M. Jouvet, Physiol. Rev., v. 47, 2, 117 (1967).
- ⁹ А. Н. Шеповальников, Активность спящего мозга, «Наука», 1971.
- ¹⁰ M. Haltia, Acta physiol. scand., Suppl., 352 (1970).
- ¹¹ А. М. Вейн, Н. А. Власов, Усп. совр. биол., 75, № 2, 295 (1973).
- ¹² E. V. Evarts, In: Neurosciences, v. 4, N. Y., 1967, p. 545.
- ¹³ А. Б. Роган, Г. Л. Фельдман, В сборн. Механизмы сна, «Наука», 1971, стр. 16.
- ¹⁴ J. Sigel, T. Gordon, Science, v. 148, 3672, 978 (1965).