

Институт проблем экологии и эволюции им. А.М. Северцова РАН

Московская школа на Юго-западе №1543

# **Влияние D-лактата, введенного в боковой желудочек мозга, на цикл сон-бодрствование у крыс**

Отчет о научно-исследовательской работе

Киндрат Степан

**Научный руководитель**

Владимир Матвеевич Ковальзон

Москва 2019

## Оглавление

Список сокращений – стр.2

Введение – стр.3

Обзор литературы – стр.3

Материалы и методы – стр.3

Ход операции – стр.4

Запись – стр.5

Результаты – стр.5

Вывод – стр.7

Список литературы – стр.8

Приложения — стр. 9

## Список сокращений

SWS- slow wave sleep

W- Wake

REM- Rapid eye movement

ANLS- Astrocyte-Neyron Lactate Shuttle

PS- Paradoxal sleep

### **Введение**

С появлением ЭЭГ стало возможно разделять фазы сна. Раньше главным признаком сна являлось отсутствие движения. Но с появлением этой технологии стало возможно выявлять, к примеру, фазы спокойного бодрствования и быстрого (парадоксального, REM) сна [1, 2]. Также физический отдых не является основной функцией сна, как показали, в частности, исследования, проведенные в 1985 Ротенбергом и Кобрином, в которых изучалась ЭЭГ людей, больных гипокинезией и акинезией. Несмотря на то, что они не двигались и не дышали произвольно, так как были подключены к системе искусственного дыхания, фазы сна были в норме, и серьезных нарушений не было выявлено. Это значит, что основной функцией сна не является физический отдых [1, 3].

Был исследован химический состав ткани мозга в разные фазы сна, и было выяснено, что уровень лактата в межклеточной жидкости меняется в зависимости от определенной фазы цикла сон-бодрствование [4].

Также более ранние исследования показывают, что лактат обладает энергетической и сигнальной функцией в мозге (к примеру, для области голубого пятна – *locus coeruleus*).

Целью нашего исследования было выяснение влияния *D*-лактата, введенного в боковой желудочек мозга крыс, на изменения в цикле сон-бодрствование.

Учитывая то, что лактат имеет сигнальную функцию и на протяжении сна его уровень меняется, можно предположить, что при введении лактата в боковой желудочек мозга крысам цикл сон-бодрствование изменится. А именно, *D*-лактат как антагонист потенциальных рецепторов лактата должен увеличивать медленный (медленноволновой) сон (SWS) и подавлять бодрствование (W) и парадоксальный сон (PS).

### **Обзор литературы**

Астроциты могут производить лактат в качестве возможного источника энергии для нейронов. Также *L*-лактат является сигнальной молекулой, в частности, для нейронов голубого пятна (*locus coeruleus*), которое, в свою очередь, является одним из основных модуляторных центров головного мозга. Если оптогенетически возбудить астроциты, то они начнут выделять лактат, стимулирующий выброс норадреналина. Если вводить *L*-лактат извне, то он будет вызывать такой же эффект. По результатам исследования предполагается наличие специального рецептора *L*-лактата в мозге [4].

Лактат в мозге можно считать плеiotропным соединением, так как он способен выполнять как сигнальные функции, так и энергетические. С помощью биосенсора кортикального лактата была исследована его внеклеточная концентрация в мозгу в разные фазы сна. Пиковой концентрацией считается фаза бодрствования (100%). Уровень лактата во время парадоксального сна также повышается и может достигать до уровня лактата во время бодрствования. В фазу медленного сна уровень лактата сильно падает - на 16,2% [5, 6].

Преимущественно астроциты переносят лактат в нейроны для обеспечения сигнальной и энергетической функции посредством ответа на активность нейронов, что говорит о связи между астроцитами и нейронами. Лактат транспортируется из астроцитов в нейроны с помощью белка-переносчика *ANLS*. Этот механизм способен регулировать уровень возбудимости нейронов [7, 8].

*D*-лактат и *L*-лактат являются оптическими изомерами. Часто свойства оптических изомеров являются противоположными. Недавно выяснили, что *D*-лактат способен действовать на рецептор *L*-лактата в качестве антагониста самого *L*-лактата [4, 7].

## Материалы и методы

Для считывания ЭЭГ и введения лактата в третий желудочек мозга понадобилась операция по вживлению в субдуральное пространство мозга электродов и многоцветной канюли. Электрод передает электрические импульсы в усилитель. Он представляет собой крошечный винт, подпаянный к медной изолированной проволоке (1,5-2 см), другой конец которой подпаян к разъему 5x2. От разъема идет шлейф к усилителю сигнала, который передает информацию по каналу *bluetooth* на компьютер, обрабатываемый специальной программой. Перед операцией крысам вводится наркоз (золетил, 35 мг/кг + медетин 10 мг/кг).

## Ход операции

Наркотизированное животное фиксировалось в стереотаксисе с помощью ушных фиксаторов, носового зажима и зубного держателя. С поверхности головы удалялась шерсть, с помощью хирургических ножниц происходило скальпирование черепа. Кость очищалась от надкостницы при помощи скальпеля и тщательно высушивалась. На чистом черепе отмечались ориентировочные места введения макроэлектродов: два над лобной корой, два над теменной и референтный электрод в ростральной части лобной кости (рис 1). С помощью специального бора в отмеченных местах сверлились трепанационные отверстия. Заранее спаянные с отводящим кабелем нихромовые электроды диаметром 200 микрон вводились в отверстия на соответствующую глубину. Канюля устанавливается в полтора мм позади брегмы, так, что ее кончик погружен в боковой желудочек. В усилителе, к которому подключаются электроды, также находится акселерометр. Плата усилителя соединена эластичной связью с источником питания, и вместе с ним прикреплена к штанге над камерой с помощью вращающегося карабина. Данная конструкция позволяет регистрировать ЭЭГ, не затрудняя перемещение животного в камере. Это позволяет плате усилителя свободно колебаться в трех плоскостях и регистрировать даже небольшие движения крысы.

После установки всех электродов ещё раз проверяется сухость и чистота черепа. После этого на весь череп тонким слоем наносится зубопротезный материал Норакрил для фиксации электродов. Далее наносится пластик холодного затвердевания. Он наносится на электроды и основу канюли, фиксируя их. После этого в мышцу крысы вводится антибиотик. Далее вводится р-р антидота для быстрого выхода их наркоза, состоящий из 1-мкл антимедина и 90 мкл р-ра Рингера. После операции животных помещали в отдельные пластиковые камеры на недельный период отдыха и восстановления без ограничений в воде и питании. Присутствовала также имитация смены дня и ночи: в 9:00 включалась яркая белая лампа, в 9:00 она заменялась слабой красной.

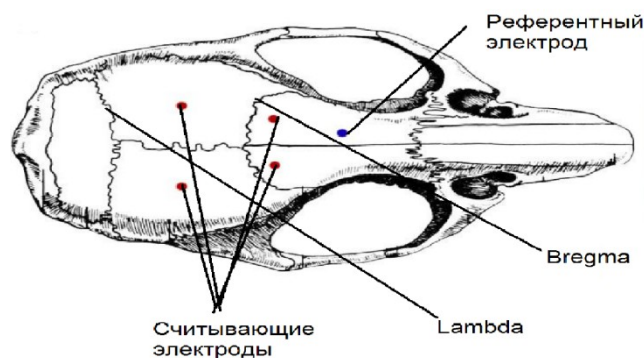


Рисунок 1 Схема постановки электродов череп крысы

## Запись

Разъем, к которому подпаяны электроды, подключается к усилителю сигнала и акселерометру. Таким образом, в программе мы получаем три показания: акселерометр, ЭЭГ лобная, ЭЭГ теменная. ЭЭГ регистрировали с частотой дискретизации 250 Гц, а двигательную активность - 50 Гц. Полисомнографическая запись включает 2 канала ЭЭГ и 3 канала движения.

Запись ведется 6 часов. Полученная запись делится на отрезки (эпохи анализа) по 20 секунд. Далее каждый отрезок надо отнести к медленному сну, быстрому сну (REM) или бодрствованию. По полисомнограмме можно точно разделять фазы сна, что позволяет делать выводы об эффекте, который оказывает введенный лактат. Визуальный полуавтоматический анализ сна по эпохам проводили с помощью специальной программы, созданной на базе EDF браузера с открытым кодом (Манолов и соавт., 2015). Для оценки представленности бодрствования, медленного и парадоксального сна мы использовали общепринятые критерии. Для ЭЭГ бодрствующей крысы характерно отсутствие синхронизации, альфа- и бета- ритмы, сравнительно низкая амплитуда, а также наличие высокоамплитудной двигательной активности, регистрируемой акселерометром. Для сна характерно отсутствие движения, в медленноволновую фазу наблюдается синхронизация и высокоамплитудный дельта-ритм, REM-фаза характеризуется особым высокорегулярным гиппокампальным тета-ритмом 6-8 Гц на фоне отсутствия сигнала акселерометра. Для проверки проходимости вводимого раствора из бокового в третий желудочек через Монроево отверстие был выполнен ангиотензиновый тест. После введения 0,5 мкг ангиотензина-2, растворенного в 2 мкл, у крысы должна появиться острая жажда (при условии появления раствора в 3-м желудочке), и она сразу побежит к поилке. Животные, не прошедшие ангиотензиновый тест, в конечную обработку не включались. При первом введении использовался D-лактат 92мкг, растворенный в 2 мкл раствора Рингера. После считывания записи, через 2 дня вводилось 2 мкл чистого раствора Рингера. Статистический анализ проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона (T-test).

## Результаты



Рисунок 2

Данная диаграмма показывает то, как зависит среднее соотношение фаз сна у крыс после экспериментального введения и после контрольного введения. Запись велась в дневное время (пик сонливости у крыс). Мы можем наблюдать увеличение количества медленного сна, а также уменьшение количества бодрствования. Данная диаграмма была составлена по данным таблицы 1. На записи после введения лактата мы можем наблюдать увеличение SWS примерно до 70% от общего времени записи. При этом бодрствование падает примерно до 25%. Также, можно заметить, что на обеих записях REM занимает меньше 15% записи.

Бодрствование (W)	Медленный сон (SWS)	Быстрый сон (REM)	Номер животного
<i>0.0237</i>	<i>0.0051</i>	<i>- 0.0197</i>	1
<i>0.117</i>	<i>- 0.1895</i>	<i>0.073</i>	2
<i>0.106</i>	<i>- 0.1315</i>	<i>0.025</i>	3
<i>0.0998</i>	<i>- 0.2334</i>	<i>0.133</i>	4
<i>0.0843</i>	<i>- 0.0797</i>	<i>-0.0046</i> 7	5
<i>0.1205</i>	<i>- 0.189</i>	<i>0.0655</i>	6
<i>0.1132</i>	<i>- 0.1702</i>	<i>0.0542</i>	7
<i>0.0966</i>	<i>- 0.0788</i>	<i>- 0.0156</i>	8
<i>-0.0026</i>	<i>- 0.0602</i>	<i>0.062</i>	9
<i>0.0768</i>	<i>- 0.0498</i>	<i>- 0.0244</i>	10

На таблице 1 мы видим разницу между раствором Рингера и D-лактатом в среднем проценте времени, проведенном в одном из состояний цикла сон-бодрствование. Первый анализ показал, что была значительная разница между средним процентом времени, проведенного в W (N = 10; T-тест Вилкоксона;  $p < 0,01$ ) и SWS (N = 10; T-тест Вилкоксона;  $p < 0,01$ ). Также нужно учитывать изначальный повышенный уровень медленного сна в это время суток. Принимая во внимание эти факты, можно сказать, что сомногенный эффект D-лактата следует считать достоверным. Эффект, оказываемый на фазу быстрого сна нельзя считать достоверным.



Рис. 3 по оси ординат отклонение акселерометра в у.е.

На данном графике мы можем наблюдать среднюю активность акселерометра на протяжении всей записи. Главным признаком активного бодрствования является движение. В первый день производилось введение D-лактата. Во второй (через 2 дня) вводился чистый раствор Рингера.

Достоверно можно сказать, что в первый день двигательная активность крыс была подавлена больше чем во второй (статистические тесты указаны в таблице).

На основании двух измерений можно сделать вывод о том, что при введении D-лактата двигательная активность и среднее время бодрствования уменьшается по сравнению с введением раствора Рингера.

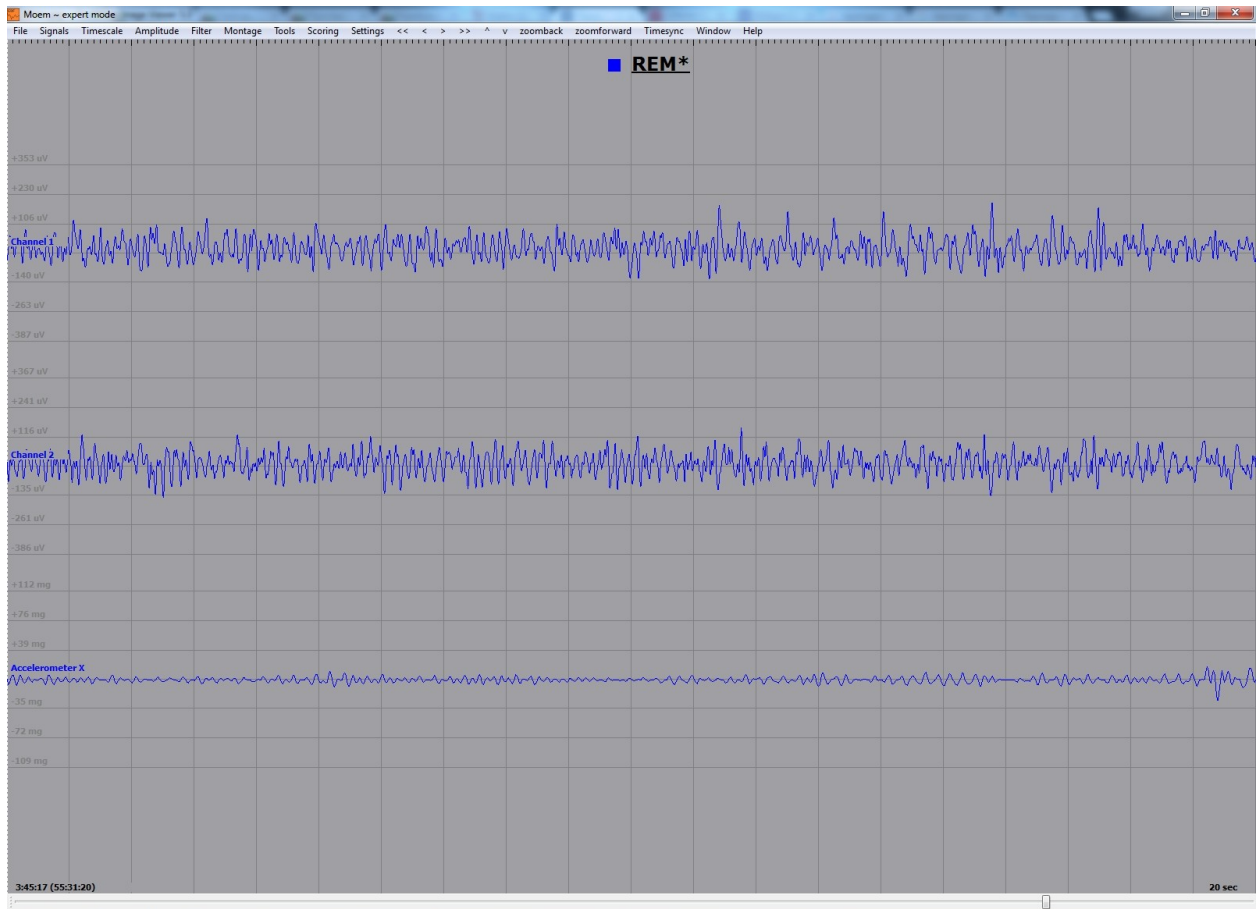
## Вывод

Гипотеза о том, что D-лактат как антагонист к рецепторам L-лактата будет вызывать противоположный эффект, то есть, снижение уровня бодрствования подтвердилась. Ангиотензиновый тест помогал убирать из выборки тех крыс, у которых могла быть нарушена проходимость третьего желудочка, к примеру, из-за неправильной постановки многоканального катетера. Основываясь на данных, которые нам удалось получить, можно сказать, что D-лактат не только понижает уровень бодрствования у крыс, но и увеличивает фазу SWS. Исследование данных акселерометра понадобилось для подтверждения данных, полученных на ЭЭГ, так как в определении сна в программе проводит человек. Поэтому совокупность данных можно считать достоверным доказательством изначальной гипотезы. Неподтвержденным остался эффект, оказываемый D-лактатом на фазу REM.

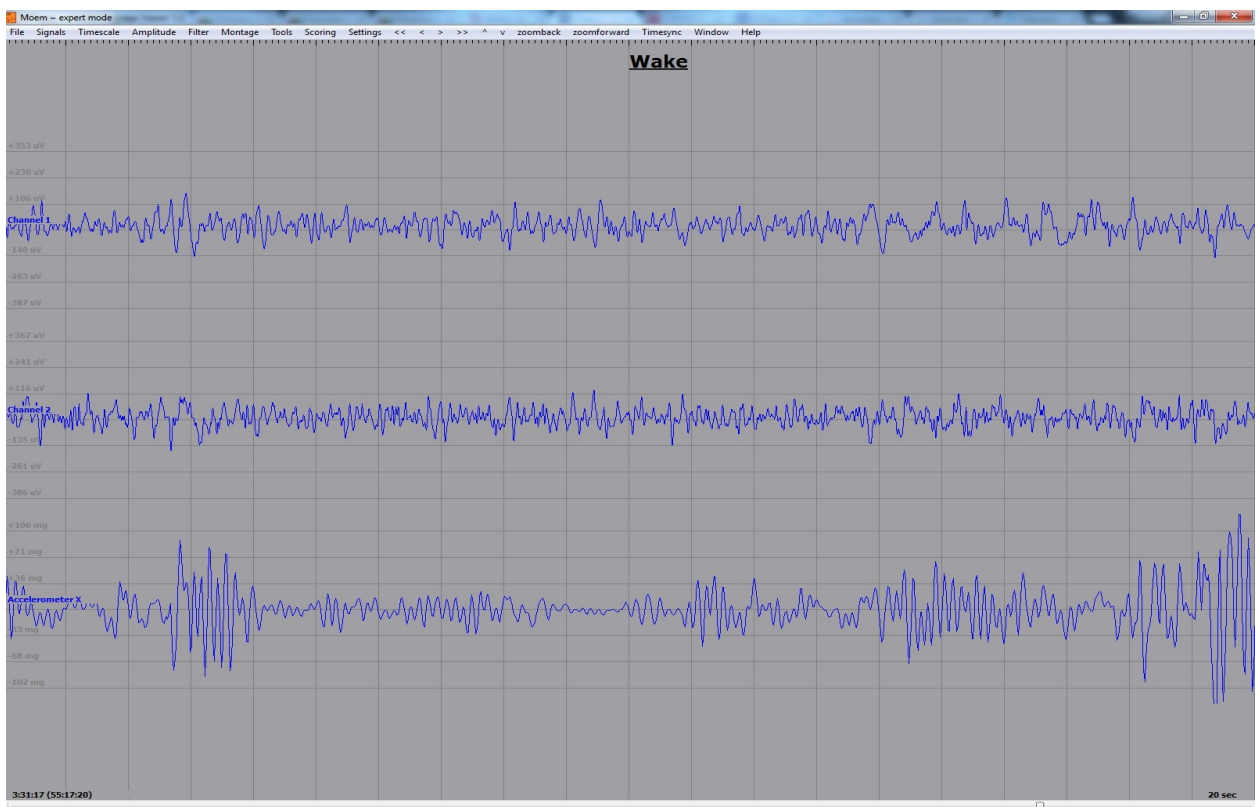
## Список литературы

- 1) Ковальзон В.М. Основы сомнологии. Физиология и нейрохимия цикла бодрствование-сон. . 2011. Изд. «Бином. Лаборатория знаний». 240 с.
- 2) Ковальзон В.М. Функциональная нейрохимия цикла бодрствование-сон в патогенезе неврологических заболеваний. Ж. неврологии и психиатрии им. Корсакова, 2017, Т. 117. №4. Вып. 2. С. 5-11.
- 3) Rotenberg V.S., Kobrin V.I. The structure of night sleep and cardiac rhythm in patients suffering for many years from hypo- and akinesia. *Activ. nerv. sup.*, 1985, 27: 179—185.
- 4) Mosienko V. et al. Putative receptors underpinning L-lactate signalling in locus coeruleus. *Neuroglia*, 2018, 1(2): 365-380.
- 5) Naylor E. et al. Lactate as a biomarker for sleep. *Sleep*, 2012, 35 (9): 1209–1222.
- 6) Aalling N.N. et al. Cerebral Metabolic Changes During Sleep. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2018, 18 (9): 57. <https://doi.org/10.1007/s11910-018-0868-92018>.
- 7) Tang F. et al. Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 3284. <https://www.nature.com/articles/ncomms4284>
- 8) Petit J.-M. et al. Genes Involved in the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle (ANLS) Are Specifically Regulated in Cortical Astrocytes Following Sleep Deprivation in Mice. *Sleep*, 2013, 36 (10): 1445–1458

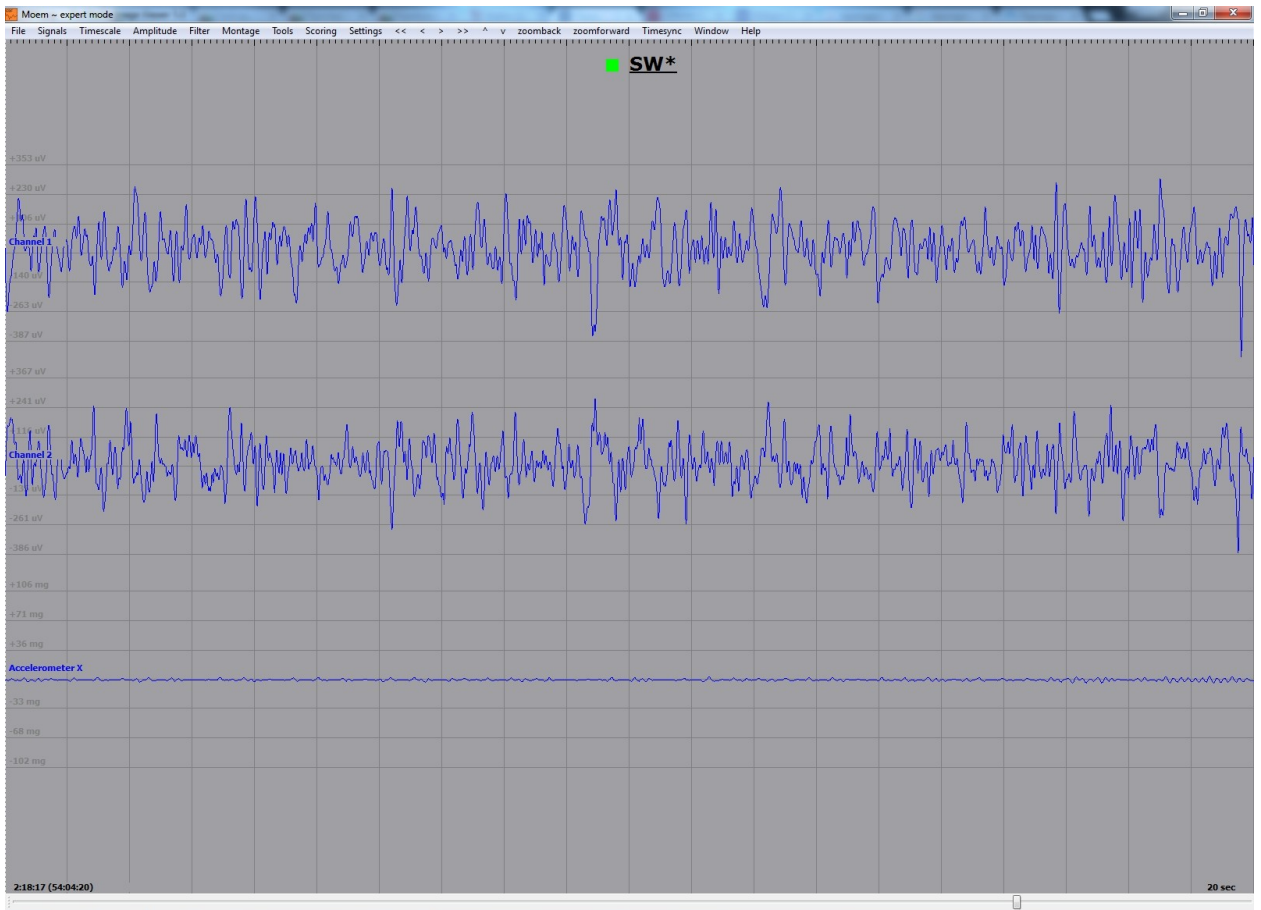
# Приложения



Пример ЭЭГ при быстром сне



Пример ЭЭГ при бодрствовании



Пример ЭЭГ при медленноволновом сне



Крыса после операции



Конструкция для записи ЭЭГ