ЭФФЕКТЫ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗУ И ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В МОЗГЕ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Кличханов Н. К., Джафарова А. М.

Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

В последние годы большое внимание исследователей привлекает проблема ишемического инсульта и связанные с ней различные способы терапевтической коррекции, одним из которых является снижение температуры тела животного – гипотермия. Церебральная ишемия, возникающая вследствие дефицита кровоснабжения части мозга, инициирует каскад реакций, результатом которых может стать развитие окислительного стресса и нарушение сбалансированной работы ряда нейромедиаторных систем мозга (Lin, 2016; Awooda, 2019). Чрезмерная генерация активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) при окислительном стрессе способствует значительному повреждению структурных элементов нейронов и нарушению их функционирования (Awooda et al., 2015). Установлено, что повреждение нейронов, связанное с ишемией, сопровождается изменениями в холинергической системе мозга (Sakuma et al., 2008; Katsuki et al., 2018), ключевым ферментом которой является ацетилхолинэстераза (АХЭ).

Одним из способов защиты мозга от развития патобиохимического каскада при ишемии является терапевтическая гипотермия (Sun et al., 2019), механизмы влияния которой на холинэргическую систему мозга и ацетилхолинэстеразу (АХЭ) до сих пор остаются не выясненными. Целью данной работы является выяснение характера изменения активности и кинетических параметров АХЭ синаптических мембран мозга при ишемии на фоне умеренной гипотермии, а также установление связи между активностью фермента и интенсивностью свободно-радикальных процессов в синаптических окончаниях нейронов.

Методы исследования. Опыты выполнены на белых крысах-самцах Вистар. Ишемия головного мозга осуществлялась под наркозом (тиопентала натрия) путем полной перевязки обеих сонных артерий в течение 60 мин. Для моделирования гипотермии ннепосредственно перед окклюзией сонных артерий температуру тела животного снижали до 33°С, обкладывая тело животного целлофановым пакетом с мелкоколотым льдом. Выделение фракции синаптосом из мозга крыс производили методом дифференциального центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы. Мембраны синаптосом получали после гипоосмотического шока и последующего центрифугирования при 32000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость – содержимое синаптосом (разведенная синаптоплазма) использовали для определения активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы

Репозиторий ГГПУ

(СОД) и каталазы (КАТ). Активность АХЭ в мембранах синаптосом определяли методом Эллмана по скорости гидролиза ацетилтиохолина. Кинетические характеристики: максимальную скорость (V_m), константу Михаэлиса (K_m) и константу субстратного ингибирования (K_i) находили методом наименьших квадратов в соответствии с моделью Холдейна. Интенсивность перекисного окисление липидов (ПОЛ) анализировали путем измерения реактивных веществ реагирующих с ТБК (ТБКРВ), в результате которого измеряется, в основном, образование малонового диальдегида. Интенсивность окислительной модификации белков (ОМБ) в мембранах синаптосом оценивали по содержанию карбонильных групп. Суммарную активность СОД в синаптоплазме определяли адренохромовым методом, (Сирота, 2013). Определение активности каталазы (КАТ) в синаптоплазме производили по методу Аеби (Aebi, 1974). Статистическая обработка данных произведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., США). Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро-Уилка. Достоверность различий между нормально распределенными данными определяли с помощью критерия Фишера на уровне значимости $p \leq 0,05$. Для оценки взаимосвязи между нормально распределенными переменными был использован корреляционный анализ Пирсона.

Результаты и их обсуждение. Обнаружено, что церебральная ишемия приводит к снижению активности АХЭ. Так, например, при концентрации субстрата равной 1 мМ уменьшение активности АХЭ составляет 18,8% относительно контроля (в контроле 126,16±8,79 мкмоль/мин/мг, при ишемии – 102,55±2,54 мкмоль/мин/мг; $p<005$). При этом значение V_{max} и эффективность катализа (V_{max}/K_m) АХЭ снижаются, а K_i увеличивается, что на фоне неизменных значений K_m способствует повышению диапазона эффективных концентраций ацетилтиохолина и значений $S_{опт}$. Мягкая гипотермия на фоне ишемии мозга препятствует существенным изменениям активности и кинетических параметров фермента.

Поскольку АХЭ заякорена в липидную матрицу, обнаруженные изменения активности и кинетических параметров АХЭ могут быть индуцированы окислительными модификациями молекул как самого фермента, так и белков, липидов в его микроокружении. Анализ интенсивности ПОЛ в синаптосомах после острой ишемии не выявил изменения исходного уровня ТБКРВ, но установил достоверный рост их накопления в инкубируемых in vitro в среде Fe^{2+}-аскорбат пробах. АФК и продукты ПОЛ, образующиеся при ишемии, способствуют окислительной модификации белков синаптических мембран, о чем свидетельствует повышение уровня карбонильных групп на 128% относительно контроля. Снижение температуры тела во время ишемии предотвращает активацию ПОЛ и ОМБ.

Интенсификация свободнорадикальных процессов при ишемии может быть связана и с изменениями в активности компонентов антиоксидантной системы. Исследование показало, что активность СОД при ишемии повышается, а активность КАТ, напротив, снижается на 58%, что приводит к

Репозиторий ГрГМУ

значительному повышению отношения СОД/КАТ. При ишемии на фоне гипотермии активность СОД остается на уровне контроля, а активность каталазы снижается как при ишемии. В результате отношение СОД/КАТ возрастет в меньшей степени, чем при ишемии.

Между кинетическими характеристиками АХЭ, уровнями карбонильных групп и ТБКРВ, а также активностью антиоксидантных ферментов обнаружены существенные корреляционные связи. Так, между значениями V_{max}, и уровнями ТБКРВ имеет место отрицательные корреляция ($r = – 0,95$, $p<0,05$). Между концентрацией исходных карбонильных групп и эффективностью катализа также имеется отрицательная корреляция ($r = -0,85$, $p<0,05$), а значениями K_i – положительная корреляция ($r = +0,95$, $p<0,05$). Так коэффициенты корреляции между V_{max}, V_{max}/K_m, K_i и отношением СОД/КАТ составляют -0,9 ($p<0,05$)., -1 ($p<0,05$) и +1 ($p<0,05$) соответственно.

Выводы. Острая церебральная ишемия оказывает существенное влияние на активность и каталитические характеристики АХЭ мембран синаптических окончаний нейронов. Умеренная гипотермия способствует их сохранению на уровне контрольных значений. Установлено, что при церебральной ишемии существенно увеличивается уровень маркеров ОМБ и ПОЛ в синаптосомах, происходит дисбаланс ключевых антиоксидантых ферментов. Гипотермия на фоне ишемии препятствует развитию окислительного стресса в синаптосомах. Обнаружена отрицательная корреляция между кинетическими параметрами АХЭ и уровнями ПОЛ И ОМБ в синаптосомах, что указывает на важную роль АФК в модуляции активности ключевого фермента холинергической системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сирота Т.В. Использование нитросинего тетразолия в реакции автоокисления адреналина для определения активности супероксиддисмутазы // Биомед. химия. – 2013. – Т. 59, №. 4. – С. 399–410.
2. Aebi H. Catalase // Methods of enzymatic analysis. Academic press. – 1974. – P. 673–684.
3. Awooda H.A. Pathophysiology of cerebral ischemia: role of oxidative/nitrosative stress // J. Biosci. Med. – 2019. – Vol. 7. – P. 20–28.
4. Awooda H.A., Lutfi M.F., Saeed A.M. Oxidative/Nitrosative Stress in Rats Subjected to Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion // Int. J. Health Sci. – 2015. – Vol. 9. – P. 17–24.
5. Katsuki H., Matsumoto K. Nicotinic Acetylcholine Receptors in Regulation of Pathology of Cerebrovascular Disorders / In Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection. Singapore: Springer, 2018. – P. 113–136.
6. Lin L, Wang X., Yu Z. Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies // Biochem. Pharmacol. – 2016. – Vol. 5, № 4. – P. 1-16.
7. Sakuma M., Hyakawa N., Kato H., Araki T. Time dependent changes of striatal interneurons after focal cerebral ischemia in rats // J. Neural Trans. – 2008. – Vol. 115 – P. 413–422.
8. Sun Y.-J., Zhang Z.-Y., Fan B., Li G.-Y. Neuroprotection by therapeutic hypothermia // Front. Neurosci. – 2019. – Vol. 11. – P. 1-11.

Репозиторий ГрГМУ