

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ
Кафедра анатомии и физиологии человека и животных

Заведующий кафедрой
к.б.н., профессор
А.В. Елифанов

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
магистерская диссертация

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ ПРОЗЕРИНА И ЭЗЕРИНА НА
КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ХОЛИНЭСТЕРАЗ ЭРИТРОЦИТОВ И
ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС

06.04.01 Биология
Магистерская программа «Биотехнология»

Выполнила работу
студентка 2 курса
очной формы обучения

Тарасова Анастасия Анатольевна

Руководитель
к.б.н., доцент

Дубровский Виталий Николаевич

Рецензент

Трофимов Олег Владимирович

Тюмень
2022

РЕФЕРАТ

С. 61, табл. 2, рис. 9, библи. 70.

В работе рассматриваются вопросы влияния прозерина и эзерина на кинетические параметры холинэстераз эритроцитов и плазмы крови крыс линии wistar. Было проведено исследование активности холинэстераз в эритроцитах и плазме крови крыс в зависимости от концентрации прозерина и эзерина в среде для определения ферментативной активности, определены величины K_m и V_{max} методом двойных обратных величин Лайнуивера и Бэрка и величина IC_{50} прозерина и эзерина для холинэстераз эритроцитов и плазмы крови крыс при использовании в качестве субстрата ацетилтиохолина и бутирилтиохолина.

Ключевые слова: ацетилхолинэстеразы, ацетилтиохолин, прозерин, эзерин

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. ХОЛИНЭРГИЧЕСКАЯ СИТЕМА	7
1.2. ОСНОВНЫЕ ТОКСИКОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ТОКСИКАНТОВ И ХОЛИНОМИМЕТИКОВ	13
1.3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ	16
1.4. БУТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА И ЕЕ ФУНКЦИИ.....	20
1.5. РОЛЬ ХОЛИНЭРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В СТРЕСС-РЕАКЦИИ ..	22
1.6. ОБЩИЕ СВОЙСТВА ХОЛИНЭСТЕРАЗ.....	29
1.7. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА, ПРОЗЕРИНА И ЭЗЕРИНА.....	32
1.8. КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ	37
1.9. АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭЗЕРИНА.....	40
1.10. НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫЕ ВЛИЯНИЯ АДРЕНОМИМЕТИЧЕСКИХ И ХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ	41
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
2.1. МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ Ошибка! Закладка не определена.	
ВЫВОДЫ.....	48
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	49

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DTNB – 5,5'-дителиобис-(2-нитробензойная кислота)

АсТХ – ацетилтиохолин

АТХ– ацетилхолин

АХЭ – ацетилхолинэстераза

БуТХ – бутирилтиохолин

ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

ХЭ – холинэстераза

ВВЕДЕНИЕ

Холинэстеразы – ферменты эффективно гидролизующие холиновые эфиры различной природы и имеющие очень широкое распространение в тканях человека и животных. Система крови млекопитающих обладает высокой холинэстеразной активностью как в составе форменных элементов прежде всего эритроцитов, так и в плазме. Активность обеспечивается двумя типами ферментов, так называемой истинной холинэстеразой или ацетилхолинэстеразой представленной в основном в эритроцитах, и ложной холинэстеразой или бутирилхолинэстеразой находящейся преимущественно в плазме крови. Вместе с тем, для холинэстераз характерно высокое разнообразие молекулярных форм, делящихся на амфифильные и неамфифильные, глобулярные и асимметрические [Драбкина, Кривой, с. 89].

Несмотря на эту гетерогенность холинэстеразы крови высокоэффективно ингибируются, как растительным алкалоидом физостигмином, так и синтетическим четвертичным аммониевым соединением неостигмином. Оба препарата получили широкое распространение в биохимической практике и медицине [Машковский, с. 697] Однако вопрос эффективности взаимодействия данных веществ с различными типами холинэстераз остается до сих пор не вполне ясным. На общую антихолинэстеразную эффективность препаратов в тканях оказывают влияние такие факторы как соотношение типов холинэстераз, а также представленность различных молекулярных форм фермента [The impact of acetylcholinesterase..., p. 893-901].

Цель: исследовать влияние прозерина и эзерина на кинетические параметры холинэстераз эритроцитов и плазмы крови крыс линии wistar.

Задачи:

1. Исследовать активность холинэстераз в эритроцитах и плазме крови крыс в зависимости от концентрации прозерина и эзерина в среде для определения ферментативной активности.

2. Определить величины K_m и V_{max} для холинэстераз эритроцитов и плазмы крови методом двойных обратных величин Лайнуивера и Бэрка.

3. Определить величину IC_{50} прозерина и эзерина для холинэстераз эритроцитов и плазмы крови крыс при использовании в качестве субстрата ацетилтиохолина и бутирилтиохолина.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ХОЛИНЭРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА

Ацетилхолинэстераза (АХЭ) является основным ферментом, который гидролизует ацетилхолин в периферической и центральной нервной системе, тем самым регулируя концентрацию АХ путем деградации. АХЭ является одним из ведущих в механизме трансдукции нервных импульсов в ХЭ синапсах животных и человека. АХЭ присутствует на высоких уровнях в мозге и нервах и на поверхностях эритроцитов. Кроме того, гидролиз ацетилхолина катализируется связанным менее специфичным ферментом, бутирилхолинэстеразой (БуХЭ), который присутствует в сыворотке крови, поджелудочной железе, печени и центральной нервной системе. Физиологическая функция БуХЭ до сих пор не была исследована до конца.

Необратимые ингибирования АХЭ в нервной системе приводит к блокаде проведения нервных импульсов, вызывая тем самым нарушения в нормальных функционированиях организменных систем и в итоге приводя к гибели организма [The impact of acetylcholinesterase..., p. 893-901]. Однако роль ХЭ системы заключается также в высвобождении адренокортикотропного гормона из гипофиза. Кроме того, АХЭ играет немаловажную роль в факторах формирования длительного стресса и депрессии, что будет рассмотрено ниже.

Исследования показали, что ингибиторы ХЭ могут применяться в терапии, при воспалительных заболеваниях, заболеваниях органов глаз для лечения глаукомы, а также во многих других сферах. Другие же ингибиторы, которые пересекают гематоэнцефалический барьер, были одобрены или находятся в клинических испытаниях для лечения болезни Альцгеймера. Некоторые ингибиторы играют существенную роль в установлении причин смерти в судебной медицине.

Исследования показали, что ингибиторы ХЭ, такие как физиостигмин и неостигмин у крыс улучшают выживаемость, так как активизируется

холинергический противовоспалительный путь. При увеличении холинергических функций, путем ингибирования двух ферментов может оказать положительное клиническое воздействие на некоторые заболевания. Исследование чувствительности ХЭ к ингибиторам *in vitro* имеет важное значение для того, чтобы оценить терапевтическую эффективность их ингибиторов. Так как крыса является животным, на которых очень часто ставят эксперименты и изучают разные виды болезней [The impact of acetylcholinesterase..., p. 893-901].

В литературных источниках указывается, что у животных с повышенной адаптацией к стрессу снижается активность ХЭ в гомогенатах хвостатого тела и надпочечников, а также обнаруживаются однонаправленные изменения активности АХЭ и Na,K-АТФазы, что указывает на участие холинергических систем в изменениях, происходящих при развитии стресс-реакции и оказывает непосредственное влияние на адаптационные характеристики к экстремальным внешним факторам [The impact of acetylcholinesterase..., p. 893-901].

Кроме того, исследование влияния и участия АХЭ в формировании стресс-реакций позволяет также оценить ее участие в формировании иммунологической реактивности и показателей иммунного статуса, изменений полового поведения крыс и антиоксидантного статуса сперматозоидов, поскольку в литературе указываются данные о морфологических изменениях в семенниках и изменениях полового поведения с учетом особенностей холинергической системы и ее влияния в данных аспектах.

Лекарственные средства, обладающие болеподавляющими свойствами, называются антихолиэстеразными. Вызывая накопление ацетилхолина в непосредственной близости от холинергических нервных окончаний, таким образом они симулируют чрезмерную стимуляцию холинергических нервных рецепторы в ЦНС и ПНС. Холинергические нейроны широко распространены, поэтому АХЭ-средства обладают широким спектром применения в качестве токсических агентов, а также в виде пестицидов и потенциальных боевых газов, обладающих нервнопаралитическими свойствами. Тем не менее, многие из

препаратов данного списка используются в качестве терапевтических агентов, а некоторые, пересекающие гематоэнцефалический барьер, применяются в клинических испытаниях лечения болезни Альцгеймера [Клиническая фармакология ..., с. 129].

До 1940х годов АХЭ были известны только обратимые, из которых особенно выделяется физостигмин, также известный как эзерин. В 1940х годах во время Второй мировой войны новый класс токсических соединений был разработан Шредером сначала в качестве пестицидов и инсектицидов, а позднее – и в качестве боевых отравляющих веществ. Крайняя токсичность фосфорорганических соединений обусловлена необратимой активацией АХЭ, приводящей к длительной ингибирующей активности. Фармакологические действия классов ПВС схожи качественно, что позволяет рассмотреть их как одну группу [Клиническая фармакология ..., с. 129].

АХЭ существенно подразделяются на два общих класса – простые олигомеры каталитических субъединиц и гетеромерные ассоциации со структурными субъединицами. Гомомеры обнаруживаются как растворимые виды в клетках, предположительно предназначенные для экспорта, или связанные с внешней мембраной клетки через внутреннюю гидрофобную аминокислотную последовательность или присоединенный гликофосфолипид. Одна гетерологичная форма, в основном обнаруженная в межнейрональных синапсах, представляет собой тетрамер каталитических субъединиц, дисульфидно связанных с субъединицей, связанной с липидом на 20 000 Дальтон. Подобно присоединенной к гликофосфолипиду форме, он находится на внешней поверхности клеточной мембраны. Другой состоит из тетрамеров каталитических субъединиц, дисульфид которых связан с каждой из трех нитей коллагеноподобной структурной субъединицы. Этот молекулярный вид, молекулярная масса которого приближается к 10^6 дальтонам, связан с базальной пластинкой соединительных участков скелетной мускулатуры [Клиническая фармакология ..., с. 129].

Метод молекулярного клонирования позволил выяснить, что один из генов кодирует АХЭ позвоночных, однако обнаруживаются множественные продукты генов. Такое разнообразие возникает благодаря альтернативной обработке мРНК. Различные формы отличаются между собой карбоксильными концами; часть генов, отвечающая за каталитическое ядро, инвариантна. Следовательно, отдельные виды АХЭ демонстрируют идентичные субстратные и ингибиторные особенности.

Отдельно взятый структурно связанный ген также кодирует бутирилхолинэстеразу, синтезируемую в печени и обнаруживаемую в основном в плазме крови [Клиническая фармакология ..., с. 148].

ХЭ-система мозга принимает участие в регуляции сложных двигательных реакций, памяти, механизме инициации двигательных стереотипов, влияет на ретикулярную формацию ствола и структуры переднего мозга. Поражение ХЭ-передачи в нервно-мышечных синапсах вызваны блокадой холинорецепторов в результате аутоиммунного процесса [Клиническая фармакология ..., с. 156].

Холинергические ретикулярные ядра ствола имеют проекции и к дофаминергическим нейронам вентральной тегментальной области, активирующие Н-холинорецепторы, в результате чего увеличивается дофаминергическая передача. Это предполагает участие холинергической медиации в процессах вознаграждения, связанных с активацией мезолимбических и мезокортикальных путей, берущих начало от дофаминергических нейронов вентральной тегментальной области. Возбуждение Н-холинорецепторов, приводящее к повышению активности этих нейронов, лежит в основе привыкания и психической зависимости к никотину при курении.

Антихолинэстеразными называются такие вещества, которые подавляют активность холинэстеразы — фермента, катализирующего гидролиз ацетилхолина. Из многочисленных веществ этой группы будут рассмотрены эзерин, прозерин, галантамин, армии, фосфакол и пирофос. Действие антихолинэстеразных веществ сходно с действием холиномиметических

агентов. Однако их действие на клетку-исполнитель не прямое, а косвенное, через ацетилхолин. Они предохраняют естественный медиатор ацетилхолин от разрушения холинэстеразой, вступая в соединение с этим ферментом. Образующийся при этом комплекс медленно гидролизуется. В связи с этим в тканях содержатся малые количества холинэстеразы и действие ацетилхолина на органы усиливается и удлиняется [Северин, с. 233]. При денервации органов (перерезка и перерождение нервов) антихолинэстеразные вещества не проявляют характерного для них эффекта. Как уже было сказано, ацетилхолин образуется у окончаний эффекторных нервов при прохождении нервного импульса. А когда нервы перерезаны, нет условий для образования ацетилхолина. В противоположность этому холиномиметические вещества и при отсутствии медиатора вызывают возбуждение холинреактивных систем. Если перерезать глазодвигательный нерв и после известного срока, необходимого для отмирания нервных окончаний, закапывать в глаз пилокарпин, то он будет сужать зрачок, в то время как эзерин этого эффекта вызывать не будет [Яковлев, с. 77].

Несмотря на различия в механизме действия, холиномиметические и антихолинэстеразные вещества, оказывая влияние как на м-холинореактивные, так и на н-холинореактивные системы, вызывают в организме очень сходные изменения. Под влиянием антихолинэстеразных веществ наблюдается спазм аккомодации, сужение зрачка и понижение внутриглазного давления, что и составляет основную ценность этих препаратов для практической медицины. Помимо этого, некоторые препараты указанной группы (прозерин) применяются для усиления сократительной деятельности матки в родах. Полагают, что ацетилхолин играет большую роль в осуществлении сократительной деятельности матки. Антихолинэстеразные вещества, инактивируя холинэстеразу, тем самым способствуют усилению действия тканевого ацетилхолина [Петров, Харламова, Никольский, с. 162].

Эзерин и прозерин являются антагонистами некоторых курареподобных препаратов с конкурентным типом действия (см. Курареподобные препараты),

применяемых при наркозе для расслабления скелетной мускулатуры. Антихолинэстеразные вещества используют как антидоты в условиях передозировки или для купирования действия курареподобных препаратов. Инактивируя фермент холинэстеразу, они способствуют накоплению ацетилхолина у окончаний двигательных нервов и восстановлению нервно-мышечной проводимости, нарушенной введением курареподобных средств.

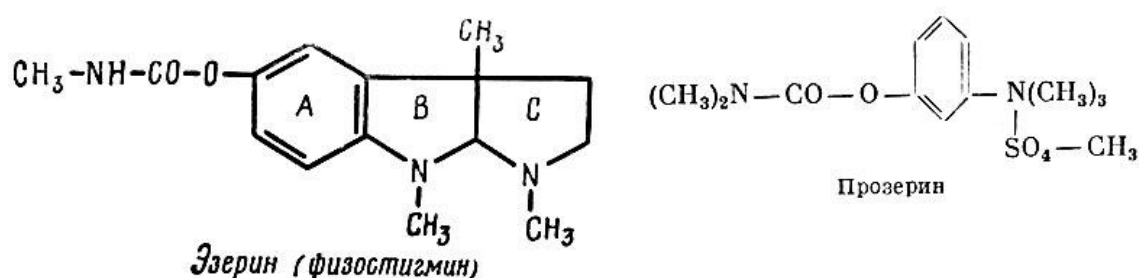


Рис. 1. Эзерин, прозерин [Нейрохимия, с. 112]

Следует упомянуть, что в природе встречается и аминокись эзерина - алкалоид генезерин [Каррер, с. 1134]

Прозерин и эзерин являются ценными терапевтическими средствами при лечении *myasthenia gravis*. Это заболевание характеризуется нарушением функции скелетной мускулатуры. Последняя находится в расслабленном состоянии. Вследствие невозможности осуществления двигательных актов больной утрачивает способность ходить, говорить, глотать и т.д. [Нейрохимия, с. 118]

Предполагается, что в основе этого заболевания лежит нарушение нервно-мышечной проводимости, связанное, возможно, с повышенной активностью холинэстеразы. Последнее обстоятельство приводит к тому, что у окончаний двигательных нервов не успевают накапливаться достаточные количества ацетилхолина, необходимые для проведения нервного импульса с нерва на мышцу. Введение антихолинэстеразных веществ временно, на известный срок, в зависимости от длительности действия препарата, восстанавливает функцию

скелетной мускулатуры, но не дает полного излечения. Поэтому при *myasthenia gravis* прозерин и сходные с ним по действию препараты вводят повторно и в течение длительного времени.

Прозерин в кишечнике, возможно, плохо всасывается или подвергается в значительной степени разрушению, вследствие чего терапевтическая доза прозерина при приеме внутрь значительно больше, чем при парентеральном введении.

Прозерин по сравнению с эзерином обладает более выраженным избирательным действием на н-холинореактивные системы скелетных мышц. На другие холинореактивные системы прозерин действует слабее [Биохимия человека, с. 108].

1.2. ОСНОВНЫЕ ТОКСИКОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ТОКСИКАНТОВ И ХОЛИНОМИМЕТИКОВ

Иммунотоксические параметры одних и тех же токсикантов могут различаться, что связано с генотипическими различиями животных, на которых проводятся эксперименты. Токсичность химических соединений обратно пропорциональна различиями токсикометрических параметров, установленных в различных экспериментах.

Известно, что ацетилхолин участвует в регуляции кальциевого метаболизма [Регуляция мускариновыми рецепторами...], поэтому нельзя исключить участия кальциевых каналов в механизмах развития патологических нарушений ритмической активности сердечно-сосудистой и дыхательной систем.

Применение блокаторов медленных кальциевых каналов в концентрациях, превышающих терапевтические уровни, может привести к побочным действиям, таким как чрезмерное сосудорасширение, отрицательная инотропия и центральное нарушение атриовентрикулярного проведения [L-type calcium channel..., p. 86-92].

Данные литературы показывают, что механизмы, отвечающие за перераспределение лимфоцитов в органах иммунной системы при интоксикации АХЭ токсикантами связано с воздействием на н-холинорецепторы надпочечников и активацией ГГНС, что приводит к росту концентрации адреналина и нордреналина, а также кортикостероидов [Забродский, Мандыч, с. 76].

Полулетальные дозы холиномиметиков, а также обратимых и необратимых ингибиторов ХЭ, существенно различаются при различных типах введения. Так, ЛД₅₀ для прозерина для крыс при внутривенном введении составляет 0,25 мг, при внутрибрюшинном – 0,30 мг, а при подкожном – 0,70 мг. У эзерина при подкожном введении ЛД₅₀ для крыс составляет 2,0-3,0 мг [Забродский, Мандыч, с. 69-70].

Эзерин в виде салицилата применяется в окулистической практике в лечении глаукомы для снижения глазного давления. В ветеринарной практике он используется для усиления престальтики кишечника. В больших дозах физостигмин является крайне ядовитым веществом, воздействуя на ЦНС и мускулатуру. Вызывая возбуждение ЦНС, он приводит в дальнейшем к парализации мускулатуры, вызывая паралич дыхательных мышц и смерть от апноэ. Смертельная доза эзерина составляет 0,01 г. [Stoycheva, Zlatev, p. 676-679]

После смерти организма при отравлении эзеринном он быстро разлагается, обнаружение его остатков является сложной судебно-медицинской экспертизой с необходимостью извлечения хлороформных остатков [Stoycheva, Zlatev, p. 676-679].

Обнаружение физостигмина в целом является трудной задачей, поскольку даже в литературе биосенсоры физостигмина описаны в единичных случаях. Прямая регистрация комплекса АХЭ-эзерин осуществима на золотом тонкопленочном электроде в монослое с регистрацией поверхностного плазмонного резонанса, однако чувствительность определения невысока - определяемые концентрации превосходят 1 мМ [Milkani, Lambert, McGimpsey, p. 212-219]. АХЭ, иммобилизованную на графите, использовали для изучения

механизма ингибирования фермента физостигмином [Stoycheva, Zlatev, p. 676-679]. Сигналом биосенсора служил ток окисления тиохолина, продукта гидролиза синтетического субстрата - ацетилтиохолина (АТХ).

Р.Р. Давлетшина с соавторами предлагает новый вариант сенсора для определения физостигмина при помощи АХЭ. В работе предложен иммобилизованный АХЭ методом связывания карбодиимидами на стеклоуглеродных электродах с углеродной сажей и фталцианином кобальта в качестве селективного медиатора окисления тиохолина [Давлетшина, Иванов, Евтюгин, с. 5-15].

Авторами установлены рабочие условия проведения иммобилизации и измерения сигнала для достижения максимальной чувствительности отклика на физостигмин, использованного в качестве модели обратимого ингибитора АХЭ [Давлетшина, Иванов, Евтюгин, с. 5-15].

В результате работы авторами был создан высокочувствительный сенсор физостигмина при помощи ацетилхолинэстеразного амперометрического сенсора. Нижний порог определяемых концентраций был определен методом подбора рабочих условий формирования поверхностного слоя и рН среды, где проводится инкубирование фермента и последующее измерение его сигнала. Экспериментальный сенсор оказался устойчив в отношении сигнала при хранении в условиях низких температур в течение трех недель. Разработка авторов позволяет использовать ее в подборе индивидуальных доз эзерина в случае комплексной терапии. Аналогичные измерения можно проводить и с другими АХЭ препаратами, используемыми при лечении нейродегенеративных заболеваний [Давлетшина, Иванов, Евтюгин, с. 5-15].

Разный характер секреции АХ в различных отделах головного мозга в сочетании с объемной холинергической трансмиссией дает теоретическое обоснование экспериментальным и клиническим фактам, свидетельствующим о корреляции между активацией холинергической трансмиссии и изменениями психического состояния людей и поведения грызунов в условиях социального стресса и депрессии. В то же время во многом остаются открытыми два основных

вопроса: какие области головного мозга отвечают за активацию ХЭ-трансмиссии при стрессе и приводят к изменениям поведения и физиологических характеристик, а также как активация ХЭ-трансмиссии влияет на нарушение моноаминовой системы, коррекция которых традиционно является основным методом лечения депрессии [Delgado, p. 7-11].

Известно, что ХЭ-трансмиссия в гиппокампе, амигдале, префронтальной коре и стриатуме модулирует изменения поведения, индуцируемые стрессорами [Sarter, Parikh, Howe, p. 383-390]. Усиление глобального или локализованного в гиппокампе холинергического тока в головном мозге вызывает у экспериментальных животных поведение, сходное с состоянием тревоги и депрессии у человека [Cholinergic signaling in the hippocampus..., p. 3573-3578]. В то же время влияние холинергической трансмиссии на изменения поведения, вызванные стрессом, носит сложный характер и зависит от области головного мозга [Cholinergic signaling in the hippocampus..., p. 3573-3578]. Стресс вызывает активацию секреции аце-тилхолина в гиппокампе и префронтальной коре [Cholinergic signaling in the hippocampus..., p. 3573-3578], но не в амигдале [Mark, Rada, Shors, p. 767-774]. Поэтому необходимы новые исследования влияния стрессоров на холинергическую трансмиссию в различных областях головного мозга экспериментальных животных.

1.3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

АХЭ является одним из наиболее изученных ферментов, а также первым синаптическим белком, который удалось выделить и очистить [Marnaу, Nachmansohn, p. 359-367]

Основной биологической ролью АХЭ следует считать ее участие в процессе передачи нервного импульса в холинергические синапсы нервной системы. При достижении потенциала действия пресинаптической мембраны происходит активация биохимических механизмов, в результате действия которых, везикулы с ацетилхолином, расположенные вблизи пресинаптической

мембраны, сливаются с ней, в результате чего медиатор высвобождается в синаптическую щель. На постсинаптической мембране также имеются рецепторы ацетилхолина, которые подразделяются на 2 типа: никотиновые (НХР) и мускариновые (МХР) [Нейрохимия: учебное пособие ..., с. 54].

Локализация АХЭ располагается в синаптической щели, где белок закрепляется на базальной мембране. Также АХЭ обнаруживается на пресинаптической и постсинаптической плазматических мембранах. Изоформы АХЭ различаются от расположения и метода заякоривания фермента. На плазматической мембране АХЭ заякоривается при помощи PRiMA-субъединицы (Proline-Rich Membrane Anchor - пролин-содержащий мембранный якорь) [Perrier, Massoulié, Krejci, p. 275-285], а на базальной мембране — при помощи нитей белка коллагена Q (ColQ) [Henny, Jones, p. 654-670]. При этом PRiMA АХЭ обычно не так многочисленна в нервно-мышечном синапсе и, в основном, распространена в центральной нервной системе, но синтез этой изоформы может индуцироваться физическими нагрузками.

АХЭ, сконцентрированная на базальной мембране, представляет собой асимметричный фермент, состоящий из гомотетрамеров глобулярных каталитических субъединиц, прикрепленных к коллагеновому хвосту [Perrier, Massoulié, Krejci, p. 275-285]. Коллагеновый хвост сформирован тремя спирально переплетенными коллагеноподобными нитями, которые кодируются одним геном ColQ [Henny, Jones, p. 654-670]. В нем могут наблюдаться мутации, которые приводят в миастенических синдромах из-за недостаточности АХЭ в синаптических щелях.

АХЭ — высокоактивный фермент; за счет высокой скорости гидролиза (4000 молекул АХ в секунду) и особого расположения каталитических центров фермента относительно АХР, индивидуального для каждого синапса, АХЭ крайне эффективно расщепляет медиатор. Активный центр 19 фермента представлен каталитической триадой остатков аминокислот — серина, гистидина и глутаминовой кислоты. Принято считать, что активный центр АХЭ представляет собой эстеразные и анионные пункты, при этом первый

осуществляет непосредственно расщепление эфирной связи, в то время как второй присоединяет головку холина.

Также в структуре АХЭ можно выделить периферический анионный пункт, отвечающий за ингибирование субстратом, а также за неконкурентное ингибирование АХЭ. В мозгу АХЭ может локализоваться с бетаамилоидными бляшками [Morán, Mufson, Gómez-Ramos, p. 362-369] и, более того, выполнять роль шаперонов бета-амилоида, агрегируя этот белок на периферическом анионном пункте (Reyes et al., 2004).

Ацетилхолиновый мускариновый рецептор (м-холинорецептор) представляет собой класс серпентиновых рецепторов, которые передают сигнал через гетеротримерные G-белки [Хухо, с. 158].

Мускариновые рецепторы — метаботропные рецепторы, ассоциированные с G-белками. Они не образуют поры для прохождения ионов, запуская, однако, каскад внутриклеточных реакций через систему вторичных посредников. Известно 5 подтипов мускариновых рецепторов (M1-M5), различающихся по типу G-белка, функции и локализации, а также действию антагонистов и блокаторов [Hulme, Birdsall, Buckley, p. 633-673]

Мускариновые рецепторы активируются мускариновыми и блокируются атропином. В нейромышечных синапсах присутствуют только никотиновые рецепторы. Мускариновые рецепторы обнаруживаются в мышечных и железистых клетках и, наряду с никотиновыми, в нервных ганглиях и нейронах центральной нервной системы.

Мускариновый рецептор любого типа состоит из одной полипептидной цепи длиной 440-540 аминокислотных остатков, с внешним N-концом и внутриклеточным C-концом [Петров, Харламова, Никольский, с. 165].

Ацетилхолин связывается с определенным участком, который расположен в складке, образованной спирально скрученными трансмембранными доменами. Аспаратный остаток в третьем трансмембранном домене участвует в ионном взаимодействии с четвертичным азотом ацетилхолина, в то время как последовательности остатков тирозина и треонина, расположенные в

трансмембранных сегментах примерно на одной трети расстояния от поверхности мембраны, образуют водородные связи с мускарином и его производными. Мускариновые рецепторы, кроме того, содержат участок (или участки), которые регулируют реакцию рецептора на большое количество соединений, в частности галамина, что снижает степень диссоциации холинергических лигандов [Страйер, с. 250].

Таким образом, эти рецепторы участвуют в передаче и модуляции таких парасимпатических эффектов, как сокращение гладких мышц, расширение сосудов, снижение частоты сердечных сокращений и усиление секреции в железах.

Мускариновые рецепторы способны изменять активность клеток, на которых они расположены, используя большое количество путей передачи сигнала. Активация биохимических путей передачи нервного импульса происходит в зависимости от природы и количества подтипа рецептора, эффекторных молекул, а также протеинкиназ, которые экспрессируются в этой ткани и возможности взаимного влияния между разными цепями передачи нервных сигналов [Тоугу, р. 159].

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (н-холинорецептор) – это такой подтип рецепторов ацетилхолина, который делает возможным передачу нервного импульса через синапсы и активируется никотином (кроме ацетилхолина). Этот рецептор входит в группу рецептор-ионных каналов.

Никотиновые рецепторы являются ионотропными и ассоциированы с каналом, проницаемым для катионов, в частности натрия (Raftery et al., 1980). Для их активации и открытия канала необходимо связывание молекул ацетилхолина со специфическими участками на рецепторе; после открытия канала ионы натрия по градиенту концентрации устремляются в постсинаптическую клетку и вызывают в ней локальную деполяризацию мембраны, то есть возбуждающий постсинаптический потенциал. Кроме постсинаптических нАХР существуют и ауторецепторы на пресинаптической клетке, активация которых регулирует синаптическую передачу, в частности,

оказывает влияние на выброс ацетилхолина [Presynaptic membrane receptors..., p. 543-554].

Данный рецептор найден в химических синапсах в центральной и в периферической нервной системе, в нервно-мышечных синапсах, эпителиальных клетках большинства видов животных.

Основной участок связывания агониста ацетилхолина расположен на наружной клеточной поверхности каждой из α -субъединиц, рядом с сегментом M1, и окружен двумя соседними остатками цистеина; для образования функционального участка связывания, эти остатки цистеина должны быть объединены дисульфидным мостиком между составляющими их атомами серы. Кроме того, для связывания ацетилхолина важным (но не всегда критическим) фактором является присутствие остатков тирозина и триптофана на данном участке [Cholinergic mechanism ..., p. 541].

Роль АХЭ в обеспечении нормального функционирования синапса значительна, соответственно, как патологические процессы, нарушающие функцию этого белка, так и антиАХЭ препараты, изменяющие его активность, способны оказывать большое влияние на нервно-мышечную передачу. Однако при нормальных, не патологических условиях, также может осуществляться регуляция активности АХЭ при помощи эндогенных механизмов

1.4. БУТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА И ЕЕ ФУНКЦИИ

Бутирилхолинэстераза, также известная как псевдохолинэстераза, ВСНЕ или BuChE, является ферментом, который у людей кодируется геном ВСНЕ [The cloned butyrylcholinesterase, p. 453]. Бутирилхолинэстераза также вызвана холинэстеразой сыворотки. Он очень похож на нейрональную ацетилхолинэстеразу и представляет собой неспецифическую холинэстеразу, обнаруженную в плазме крови, которая гидролизует много различных сложных эфиров холина. Бутирилхолин является синтетическим соединением и не встречается в организме естественным образом. Он

использован как инструмент для того, чтобы различить между ацетил - и бутирилхолинэстеразой [The cloned butyrylcholinesterase, p. 454].

Дефицит псевдохоллинэстеразы приводит к задержке метаболизма лишь нескольких соединений, имеющих клиническое значение, включая следующие: сукцинилхолин, мивакурий, прокаин и кокаин. Из них наиболее клинически важным субстратом является деполяризующий нервно-мышечный блокирующий агент сукцинилхолин, который фермент псевдохоллинэстеразы гидролизует до сукцинилмонохолина, а затем до янтарной кислоты [Most efficient cocaine ..., p. 130].

У лиц с нормальными плазменными уровнями нормально функционирующего фермента псевдохоллинэстеразы гидролиз и инактивация примерно 90-95% внутривенной дозы сукцинилхолина происходит до того, как он достигает нервно-мышечного перехода. Оставшиеся 5-10% дозы сукцинилхолина действуют как агонист рецептора ацетилхолина в нервно-мышечном соединении, вызывая длительную деполяризацию постсинаптического соединения моторно-концевой пластины. Эта деполяризация первоначально запускает фасцикуляцию из скелетной мускулатуры. В результате длительной деполяризации эндогенный ацетилхолин, высвобождаемый из пресинаптической мембраны моторного нейрона, не вызывает дополнительного изменения мембранного потенциала после связывания его с рецептором на миоците. Вялый паралич скелетных мышц развивается в течение 1 минуты. В нормальных вопросах, функция скелетной мышцы возвращается к нормальному приблизительно через 5 минут после одиночной инъекции болюса сукцинилхолина по мере того, как она пассивно отражает далеко от нервно-мышечного соединения. Дефицит псевдохоллинэстеразы может привести к более высоким уровням интактных молекул сукцинилхолина, достигающих рецепторов в нервно-мышечном соединении, в результате чего продолжительность паралитического эффекта будет продолжаться до 8 часов. Это состояние признается клинически, когда паралич дыхательных и других скелетных мышц не удается спонтанно решить

после введения сукцинилхолина в качестве вспомогательного парализующего агента во время процедур анестезии. В таких случаях требуется респираторная помощь.

В 2008 году был открыт экспериментальный новый препарат для потенциального лечения злоупотребления кокаином и передозировки, основанный на структуре псевдохолинэстеразы. Было показано, что он удаляет кокаин из организма в 2000 раз быстрее, чем естественная форма ВСНЕ [Most efficient cocaine ..., p. 130]. Исследования на крысах показали, что препарат предотвращал судороги и смерть при передозировке кокаина. Этот фермент также метаболизирует сукцинилхолин что объясняет его быструю деградацию в печени и плазме. Возможно, существует генетическая изменчивость в кинетике этого фермента, которая может привести к длительной мышечной блокаде и потенциально опасной дыхательной депрессии, которую необходимо лечить с помощью вспомогательной вентиляции.

Активность псевдохолинэстеразы в сыворотке крови низкая, а ее субстратное поведение нетипично. В отсутствие релаксанта гомозигота не находится в заведомо невыгодном положении.

1.5. РОЛЬ ХОЛИНЭРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В СТРЕСС-РЕАКЦИИ

В стресс-реакции принимает активное участие парасимпатическая нервная система и ГНС [Vinnet, p. 391-410]. Однако первичные процессы стресс-реакции в литературе остаются неидентифицированными либо освещены достаточно слабо.

Стресс-реакция вызывает не только изменения физиологического состояния, но и адаптивные изменения поведенческих функций, которые обусловлены индуцированными стрессорами головного мозга процессами. В полушариях происходит формирование сигналов, поступающих в гипоталамус и вызывающих активацию симпатической нервной системы и оси ГНС, что и вызывает изменение поведенческих реакций. Однако, несмотря на большое

количество исследований данной сферы, центральные процессы стресс-реакций и их механизмы остаются открытыми из-за сложности организации ЦНС.

В то же время, в последние годы появляются все большее количество исследований о ключевой роли холинэргической системы в формировании реакции ЦНС на стресс, а также о ее влиянии на формирование депрессии у людей [Picciotto., Higley, Mineur, p. 116-129; Gilad, p. 116-129]. Данная гипотеза базируется на результатах исследований о роли ХЭ-системы в развитии депрессии. Впервые эта гипотеза была сформулирована еще в 1972 г. Далее в исследованиях 1980 г. было показано, что введение в организма человека ингибиторов АХ-эстеразы эзерина вызывает тревожность и депрессию, а повышение уровня кортизола активирует ГГНС [Mood and behavioral effects..., p. 1545-1546].

Известно, что однократное психотравматическое воздействие может служить запускающим стимулом для развития расстройств аффективного профиля, в частности, — ПТСР. Однако развитие посттравматического расстройства — только один из возможных исходов переживания психотравматического воздействия. Не для всех лиц, подвергшихся переживанию психотравматической ситуации, она становится психотравмирующей, т. е. приводящей к формированию психической травмы. Более того, не у всех лиц, перенёвших психическую травму, происходит развитие посттравматического расстройства. Риск развития посттравматической, или постстрессовой, патологии обусловлен, с одной стороны, обстоятельствами переживания субъектом психотравматической ситуации, а с другой — функционированием его механизмов защиты.

Согласно новейшим исследованиям, развитие депрессии включает в себя активацию ХЭ-системы. Эксперименты с грызунами подтвердили, что повышение уровня АХ в головном мозге при введении эзерина вызывает изменение поведенческих реакций, сходных с развитием депрессии у людей. При введении эзерина в гиппокамп также активирует подобные изменения, что показывает влияние гиперактивности холинэргической трансмиссии в

гиппокампе на развитие стресс-реакций длительного характера [Higley, Picciotto, pp. 88-95].

Однако долгое время роль гиперактивации ХЭ-системы оставалась непонятной в адаптивных изменениях поведенческой симптоматики. Проблема заключалась в том, что стресс и депрессия являются состояниями функций головного мозга, длящимися десятки минут, часы и дни. Состояние функций ЦНС, как правило, рассматривается в связи с системами нейромодуляторов (серотонин, дофамин, норадреналин), которые осуществляют так называемый объемный механизм передачи информации диффузией нейромодуляторов в межнейрональном пространстве, изменяя быструю синаптическую трансмиссию, осуществляемую нейротрансмиттерами (АХ, глутамат, ГАМК). В связи с тем, что АХ, секретлируемый нейронами, гидролизуется АХЭ, считалось, что в ЦНС его возбуждающее действие, по аналогии с нервно-мышечными синапсами, ограничивается синапсом (пространство между пресинаптическим и постсинаптическим нейронами). Поэтому традиционно состояния стресса и депрессии в головном мозге объяснялись активацией серотонинергической и норадренергической систем, но не холинергической системы [Delgado, p. 7-11; Delgado, Moreno, p. 5-12].

Холинэргическая система также участвует в развитии послеоперационных когнитивных расстройств. Одной из ведущих причин развития делирия в послеоперационном периоде также считается дефицит ацетилхолина с последующей дисфункцией холинергической системы. К патогенетическим механизмам, которые могут приводить к развитию этих осложнений, относят: периферический воспалительный ответ организма на хирургическую травму с последующим развитием воспаления нейронов, нарушение целостности гематоэнцефалического барьера с дальнейшим нейрональным повреждением, нарушение церебральной ауторегуляции, снижение доставки кислорода, гипергликемию, предшествующие нейродегенеративные заболевания, накопление металлов в головном мозге.

Все литературные представления о клеточных и молекулярных механизмах поведения при регуляции АХ можно свести к следующему:

1. Если в нервно-мышечных синапсах и периферических ганглиях АХ является возбуждающим нейротрансмиттером, то в головном мозге он в основном выполняет функции нейромодулятора, осуществляющего медленные процессы объемной передачи информации [Higley, Picciotto, pp. 88-95].
2. АХ в качестве нейромодулятора, функционирующего в межнейрональном пространстве, приводит к активации м- и н-холинорецепторов, локализованных вне синапсов [Picciotto., Higley, Mineur, p. 116-129].
3. Медленная холинергическая трансмиссия, вызывающая фазные изменения активности больших ансамблей нейронов, происходит из-за специфичности молекулярных форм АХ-эстеразы в головном мозге [Dunant, Gisiger, p. 1300].

Исследования молекулярных форм АХЭ в головном мозге грызунов показывают, что она может осуществлять объемный механизм передачи информации путем диффузии в пространстве между нейронами. Функции АХЭ существенно различаются в нервно-мышечных синапсах и головном мозге. В нервно-мышечных синапсах АХЭ представляют собой фермент, состоящий из каталитических субъединиц, связанных с коллагеновым хвостом. Молекулы АХ, секретлируемые моторными нейронами, достигают никотиновых рецепторов в мышцах, и чрезвычайно быстро активируется А12 АХЭ.

Холинергическая гипотеза депрессии рассматривается как современная альтернатива моноаминовой гипотезе. Одним из аргументов в пользу холинергической гипотезы является то, что она подтверждается не только в условиях развития поведения грызунов, сходного с депрессией в результате хронического действия стресса, но и в условиях адаптивных изменений поведения и физиологического состояния однократным стрессом.

Известно, что наступление клинического эффекта применения антидепрессантов при депрессии наступает не ранее двух-трёх недель от начала приёма препарата. Отсроченность эффекта представляется возможным объяснить за счёт изменения в течение указанного срока интенсивности пролиферации в нейрогенных зонах мозга и облегчения миграции нейробластов к областям их окончательной дифференцировки и встраивания. Кроме того, подтверждение этой гипотезы позволило бы ответить на вопрос о первичной или вторичной вовлечённости нарушений нейрогенеза, наряду с дисбалансом нейромедиаторных систем, в патогенез депрессивных расстройств.

Между холинэргической и моноаминовой гипотезой нет принципиальных противоречий в том случае, если активация холинэргической трансмиссии при стрессе первична по отношению к переменам моноаминовой системы головного мозга, однако исследований на эту тему практически нет.

Однако факты, являющиеся основой холинэргической гипотезы стресса, сомнения не вызывают. Повышение уровня АХ при введении физостигмина инъекционным путем вызывает те же изменения поведенческих характеристик и физиологических параметров у грызунов точно такие же, как и стресс. В то же время, действия хронического стресса, вызывающего изменение поведенческих функций у грызунов, сопровождаются неизменным повышением уровня АХ в головном мозге животных.

Изучение активности ХЭ-системы при стрессорных воздействиях в целом в литературе описывается мало. В работе Х. Анисмана оказано снижение уровня ацетилхолина в мозге при иммобилизационном стрессе [Anisman, p. 119-171] и значительное уменьшение активности АХЭ в гиппокампе у длительно стрессированных крыс [Sunanda, Shankaranarayana, Raju, p. 15471-1552].

Влияние холинэргической системы на проявление поведенческих функций в процессе различных стрессовых воздействий исследовано недостаточно, а ее роль в механизмах реализации полового поведения при различных видах стресса практически не изучена.

В работе А.А. Байрамова с соавторами показано, что 6-часовой острый иммобилизационный стресс вызывал угнетение половой активности самцов подопытных крыс, поскольку имела место значительная альтерация почти всех параметров полового поведения. Было отмечено снижение показателей копуляторного и эякуляторного поведения, значительное увеличение временных компонентов полового поведения. Мотивационные показатели при этом изменялись незначительно [Байрамов, Кудрявцева, Торкунова, с. 1183-1190].

Авторы отмечают, что иммобилизационный стресс приводит к угнетению половой активности и выраженному изменению содержания нейромедиаторов и их оборота в структурах мозга, участвующих в регуляции полового поведения. Изменение уровня активности этих нейромедиаторных систем является основным фактором, ответственным за нарушение половой активности после стресса. Исходя из нейропротекторного эффекта холинотропных препаратов, можно сделать заключение, что м-холинореактивная система играет важную роль в механизмах реализации ПП при стрессе. По мнению авторов, эффект холинотропных препаратов на половую активность при стрессе, помимо их прямого влияния на центральные нейрональные механизмы регуляции полового поведения, также обуславливается ХЭ-модуляцией активности других медиаторных систем мозга, в большей степени дофаминергической медиаторной системы [Байрамов, Кудрявцева, Торкунова, с. 1183-1190].

При воздействии химических веществ важной особенностью нарушений гомеостаза является непосредственное повреждающее влияние на различные механизмы регулирования гомеостаза, начиная от низших уровней до гипоталамических и кортикальных. В этом случае нарушение процессов регуляции становится ведущим патогенетическим механизмом химической интоксикации.

Стресс-реакция в начале интоксикации маскируется типичными для данного яда симптомами отравления, и лишь в дальнейшем проявляются общие биохимические и функциональные сдвиги, характерные для соответствующей стадии стресса.

Наиболее серьезные сдвиги гомеостаза наступают при остром воздействии летальных и сублетальных доз яда. Стресс-реакция при острых экзогенных отравлениях не всегда протекает однотипно и имеет ряд особенностей в зависимости от того, какой конкретный патологический механизм лежит в основе отравления.

При тяжелых интоксикациях может происходить ослабление физиологических механизмов стресса. Это проявляется в большей степени, если отравление протекает с резким напряжением вегетативной и гуморальной регуляций жизненных функций в связи с непосредственным вмешательством холинотропных веществ в функционирование гипоталамо-адренальной системы.

Адаптивные возможности организма при воздействии химических факторов внешней среды зависят от того, на какое звено холинергической системы действует токсический агент.

К холинергическим нейронам относятся: спинальные мотонейроны, терминали которых находятся на вставочных нейронах и скелетных мышцах позвоночных; парасимпатические постганглионарные нейроны, терминали которых расположены в гладких мышцах; симпатические и парасимпатические преганглионарные нейроны; часть нейронов ствола, зрительного бугра и среднего мозга.

Несмотря на ограниченность холинергического представительства в нервной системе компоненты системы АХ включаются в реакцию экстренной адаптации с самого начала действия экстремальных факторов и участвуют в формировании неспецифического и специфического компонентов.

Метод определения маркеров стресс-реакции после в/м введения неостигмина основан на взаимодействии 2,4-нитрофенилгидразина с дегидроаскорбиновой кислотой (ДАК) с образованием в серной кислоте соответствующего озона. Аналогично протекает реакция с дикетогулоновой кислотой (ДКГ). Озоны ДАК и ДКГ дают красное окрашивание, что используется для фотометрического определения. Для вычисления суммы всех фракций аскорбиновой кислоты (АК) их окисляют 2,6-

дихлорфенолиндофенолятом натрия (2,6ДХФФН). Содержание аскорбиновой кислоты определяют по разности между содержанием суммы всех фракций АК (АК, ДАК, ДКГ) и содержанием окисленных форм АК (ДАК, ДКГ). Для дифференцированного определения дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот, смесь подвергают действию восстановителя, при этом восстанавливается в АК только ДАК. В качестве восстановителя используется унитиол.

Результаты изучения активности АХЭ и содержания аскорбиновой кислоты в надпочечниках животных, свидетельствуют об активации секреторной деятельности надпочечников у крыс после иммобилизации и в процессе адаптации к иммобилизационному стрессу.

1.6. ОБЩИЕ СВОЙСТВА ХОЛИНЭСТЕРАЗ

В организме человека есть два фермента, связанных с холинэстеразой - это группа ферментов из класса гидролаз карбоновых кислот, субстратами которых являются сложные эфиры холина. Фермент – ацетилхолин-ацетилгидролаза, тривиальные названия – ацетилхолинэстераза, ацетилхолингидролаза, также называемая "истинной холинэстеразой" или "холинэстеразой I". Обнаруживается в эритроцитах, легких, селезенке, нервных окончаниях, сером веществе головного мозга. АХЭ участвует в передаче нервного импульса по синапсу, участвуя в процессе деполяризации нерва [Степанов, с. 22].

Обычно сыворотка ХЭ в организме человека выполняет функцию защиты. В частности, она защищает от инактивации АХЭ, поскольку с высокой скоростью гидролизует ингибитор этого фермента БТХ, который образуется при обмене жирных кислот [Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов, с. 121]. Кроме того, холинэстераза может гидролизовать многие токсичные фосфорорганические вещества и карбаматы, которые попадают в организм извне. Было показано, что введение в кровь животных сыворотки лошадей или рекомбинантной холинэстеразы человека защищает их на 100% от смертельных доз газов зарина, зомана и Vx. [Денисенко, с. 111]. Холинэстераза является

основным ферментом, который превращает кокаин и его производные в нетоксичные продукты распада. Таким образом, лекарственные средства на основе ХЭ могут быть использованы в случае передозировки этого психоактивного вещества. Холинэстераза принимает участие в нормализации содержания холина в плазме крови и его восстановлении. Показано что, активность ХЭ связана с причиной ожирения человека и липидным составом кровяной сыворотки. Холинэстераза также играет роль в регуляции пролиферации клеток при эмбриогенезе [Chatonnet, Lockrige, p. 630]. Она также обуславливает проницаемость клеточных мембран и сосудистых стенок.

Ингибитор – это вещество, снижает активность катализатора (каталитические яды). Ингибиторами холинэстеразы являются некоторые природные и синтетические соединения: фосфорорганические соединения (ФОС), эфиры N-алкилкарбоновых кислот (карбаматы), четвертичные аммониевые основания, гетероциклические соединения, содержащие третичный или четвертичный атом азота (таблица 1).

Таблица 1

Ингибиторы холинэстеразы и их действие

Класс соединений	Тип связи с холинэстеразой	Ингибирование	Препараты
Фосфорорганические соединения	Ковалентная в активном центре	Необратимое	хлорофос, тиофос, армин, зарин, табун
Карбаматы	Ковалентная связь в активном центре	Обратимое	физостигмин, неостигмин(прозерин), аминокарб
Четвертичные аммониевые и гетероциклические соединения	Комплекс с анионным	Конкурентное	алкалоиды, галантаминтакрин,

	центром фермента		донепезил, эдрофоний хлорид
--	---------------------	--	--------------------------------

ФОС и карбаматы иногда называют «полусубстратами» или «плохими субстратами». ФОС гидролизуется в активном центре фермента, остаток фосфорила взаимодействует с ОН – группой серина активного центра с образованием «фосфорил – фермента». Следующая стадия катализа – гидролиз «фосфорил – фермента» с водой и образование свободного фермента – идет очень медленно, так что активность фермента не восстанавливается. Процесс является необратимым. Активность «фосфорил – фермента» можно восстановить при помощи реактиваторов (например: дипироксима), который вытесняет остаток фосфорила из связи холинэстеразы и молекула фермента освобождается для взаимодействия с субстратом.

Фосфоорганические соединения оказывают мощное отравляющее действие на организм. Причиной отравления является накопление не гидролизованного ацетилхолина, которое приводит сначала к ускорению проведения нервных импульсов (возбуждение) и далее к блокированию передачи нервных импульсов (паралич). ФОС используют в качестве боевых отравляющих веществ (БОВ), инсектицидов лекарственных средств. Карбаматы, так же, как и ФОС, гидролизуются в активном центре фермента, отщепленный остаток карбаминовой кислоты взаимодействует с ОН-группой серина с образованием «карбамоил – фермента» [Голиков, Розенгарт, с.115].

Следующая стадия катализа – его гидролиз водой и образование свободного фермента – идет быстрее, чем гидролиз «фосфорил – фермента», но медленнее, чем природных «ацил - ферментов». Активность холинэстеразы блокируется карбаматами на несколько часов и затем восстанавливается. Это обратимый тип ингибирования. Карбаматы широко используются в качестве лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний, при параличах и других болезнях. Описано также масштабное применение

физостигмина – обратимого ингибитора холинэстеразы – в качестве профилактического средства от возможного отравления.

Ферментативная активность ингибирует фосфорные органические соединения и мочевины, относящиеся к инсектицидам и токсичным веществам. При таком отравлении снижение активности ХЭ на 40% приводит к появлению первых симптомов, при снижении на 80% возникают нервно-мышечные расстройства. Сильная степень отравления, вызванная снижением активности ХЭ более чем на 80%, представляет опасность для жизни. Пациенты с низкой генетически контролируемой активностью ХЭ имеют высокую чувствительность к таким отравлениям [Expression and possible, p. 2377].

В случаях, исключающих действие ингибиторов ферментов, при отсутствии генетических причин низкой активности ХЭ любое снижение активности ХЭ в сыворотке крови приводит к нарушению синтеза ферментов в печени. Альбумин, фибриноген, наряду с уровнем протромбина, является белком синтетическим маркером функции печени, который определяет активность ХЭ в сыворотке крови. Снижение активности на 30-50% наблюдается при остром и хроническом гепатите, снижение активности на 50-70% происходит при усиливающем циррозе и карциноме с образованием метастаз в печени [Expression and possible, p. 2377].

1.7. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА, ПРОЗЕРИНА И ЭЗЕРИНА

Прозерин – четвертичное аммониевое основание, неостигмина метилсульфат. Вещество слабо проникает через гематоэнцефалический барьер и практически не оказывает центрального действия. Метаболизируется в печени с образованием неактивных метаболитов. Является синтетическим ингибитором ХЭ, обратимо блокируя ее и потенцируя действие эндогенного АХ. Это приводит к накоплению АХ и усилению его действия на ткани и органы, способствует восстановлению нервно-мышечной проводимости. Вызывает брадикардию,

повышает секрецию внутренних желез, приводит к развитию гиперсаливации [Прозерин].

Прозерин связывается с анионным и эстеразным центрами молекулы ацетилхолинэстеразы, обратимо экранирует их от ацетилхолина, в результате чего останавливается его энзиматический гидролиз, ацетилхолин накапливается и усиливается холинергическая передача. Суживает зрачки, снижает внутриглазное давление, вызывает спазм аккомодации, брадикардию, повышение тонуса и сократимости гладкой мускулатуры бронхов (до бронхоспазма), ЖКТ и мочевого пузыря (утеротонизирующее действие), усиление секреции бронхиальных, пищеварительных, включая слюнные, потовых и других экзокринных желез; облегчает нейромышечную передачу, но в больших дозах может ее угнетать (развивается стойкая деполяризация постсинаптической мембраны скелетной, в т.ч. дыхательной, мускулатуры). В терапевтических дозах не оказывает центрального действия, т.к. трудно проникает через ГЭБ (в токсических дозах угнетает ЦНС). Оказывает прямое холиномиметическое действие на холинорецепторы скелетной мускулатуры, вегетативных ганглиев и нейронов ЦНС [Неостигмина метилсульфат].

Гидролизуется ХЭ. Связывается с белками в крови – около 15-25% от введенной дозы. После введения в/м быстро выводится из-за быстрой абсорбции. Около 80% выводится почками в течение суток, из них 50% в неизменной форме, 30% в виде неактивных метаболитов. При внутривенном введении $T_{1/2}$ из плазмы составляет в среднем 53 мин. При приеме перорально слабо абсорбируется в ЖКТ [Неостигмина метилсульфат].

При передозировке наступает холинэргический криз, проявляющийся в виде миоза, тошноты, усиления перистальтики кишечника, диареи, частого мочеиспускания, нарастающей мышечной слабости с распространением на дыхательные мышцы вплоть до мышечного апноэ с возможностью летального исхода [Неостигмина метилсульфат].

Физостигмин, также известный как эзерин – алкалоид калабарских бобов. Применяется в основном в качестве физостигмина салицилата. Трудно

растворим в воде (1:100), растворим в спирте (1:12), мало растворим в эфире. Водный 0,5% раствор имеет рН 5,8. Растворы и сам порошок на свету и при контакте с воздухом приобретают красный цвет и теряют активность.

Является холиномиметиком непрямого действия, вызывает обратимую блокаду ацетилхолинэстеразы, повышает концентрацию ацетилхолина, усиливает холинергическую передачу. Вызывает миоз (сужение зрачка наступает обычно через 5–15 мин и продолжается 2–3 ч и более), понижает внутриглазное давление, замедляет сердцебиение, усиливает перистальтику желудка, кишечника, восстанавливает нервно-мышечную проводимость. Легко проникает через ГЭБ. В малых количествах элиминируется с мочой, в значительной степени разрушается в организме путем гидролиза [Физостигмин]. Действие ацетилхолина на мембрану состоит в его реакции с холинорецепторами, входящими в структуру клеточной мембраны (Рисунок 2).

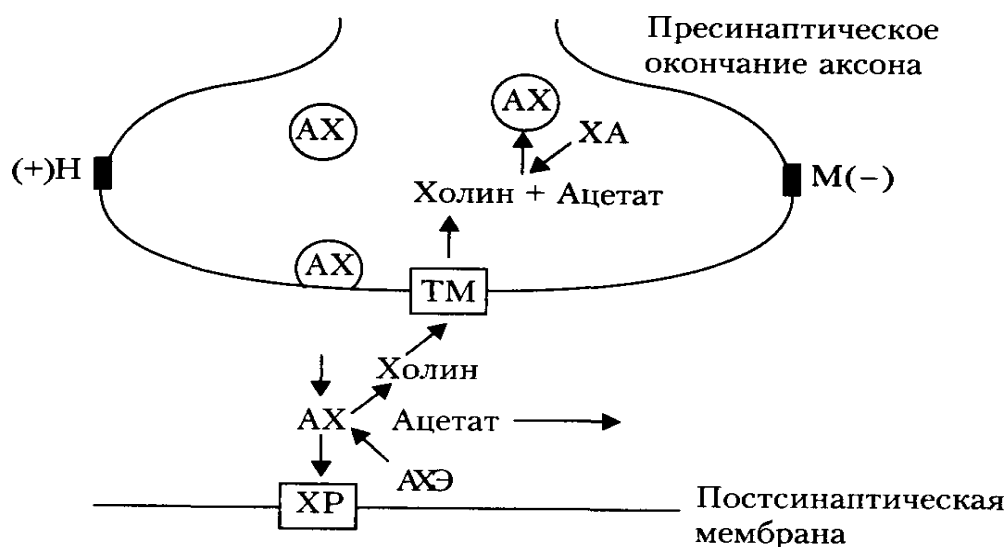


Рис.2. Схема взаимодействия ацетилхолина с холинорецептором и ацетилхолинэстеразой (цит. по: Закусов В. В., 1973):

ХР — холинорецептор; АХЭ — ацетилхолинэстераза; А — анодный центр ХР и АХЭ; Э — эстеразный центр АХЭ и эстерофильный центр ХР [Клиническая биохимия, с. 330].

Так, реакция ацетилхолина с Н-холинорецептором вызывает изменение пространственного расположения атомов белковой молекулы рецептора. В результате увеличивается размер межмолекулярных пор мембраны, образуя свободный проход для ионов Na^+ , а затем и K^+ , и происходит деполяризация клеточной мембраны с последующей реполяризацией [Диксон, Уэбб, с. 212]. Вызываемые ацетилхолином изменения молекулы рецептора легко обратимы. После передачи импульса уже приблизительно через 1 мс заканчивается деполяризация и восстанавливается обычная проницаемость мембраны. К этому времени холинорецептор уже свободен от связи с ацетилхолином. Полагают, что вызываемая ацетилхолином деформация молекулы рецептора приводит не только к увеличению межмолекулярных пор мембраны, но и способствует отторжению ацетилхолина от рецептора. Отторжение это необходимо для взаимодействия освобождающего ацетилхолина с ацетилхолинэстеразой и его последующего разрушения (Рисунок 2). Вещества, влияющие на холинорецепторы, способны вызывать стимулирующий холиномиметический) или угнетающий (холинолитический) эффект [Диксон, Уэбб, с. 212].

В холинергических синапсах (парасимпатические нервы, преганглионарные симпатические волокна, ганглии, все соматические) передача возбуждения осуществляется медиатором ацетилхолином. Ацетилхолин образуется из холина и ацетилкоэнзима А в цитоплазме окончаний холинергических нервов.

Холинорецепторы, возбуждаемые ацетилхолином, обладают неодинаковой чувствительностью к некоторым фармакологическим средствам. На этом основано выделение так называемых: 1) мускариночувствительных и 2) никотиночувствительных холинорецепторов, то есть М- и Н-холинорецепторы. М-ХР расположены в постсинаптической мембране клеток эффекторных органов у окончаний постганглионарных холинергических (парасимпатических) волокон, а также в ЦНС (кора, ретикулярная формация). Н-ХР находятся в постсинаптической мембране ганглионарных клеток у окончаний всех

преганглионарных волокон (в симпатических и парасимпатических ганглиях), мозговом слое надпочечников, синокаротидной зоне, концевых пластинках скелетных мышц и ЦНС (в нейрогипофизе, клетках Реншоу и др.). Чувствительность к фармакологическим веществам разных Н-холинорецепторов неодинакова, что позволяет выделять Н-ХР ганглиев и Н-ХР скелетных мышц.

Взаимодействуя с холинорецепторами и изменяя их конформацию, тилхолин изменяет проницаемость постсинаптической мембраны. При возбуждающем эффекте ацетилхолина ионы Na проникают внутрь клетки, приводя к деполяризации постсинаптической мембраны. Это проявляется локальным синаптическим потенциалом, который достигнув определенной величины, генерирует потенциал действия. Местное возбуждение, ограниченное синаптической областью, распространяется по всей мембране клетки (вторичный мессенджер - циклический гуанозинмонофосфат - цГМФ).

Действие ацетилхолина очень кратковременно, он разрушается (гидролизуется) ферментом АХЭ.

Фармакологические вещества могут воздействовать на следующие этапы синаптической передачи холинергических синапсов: 1) синтез АХ; 2) процесс высвобождения медиатора; 3) взаимодействие АХ с холинорецепторами; 4) разрушение АХ; 5) захват пресинаптическим окончанием холина, образующегося при разрушении АХ [Клиническая биохимия, с. 332].

Например, на уровне пресинаптических окончаний действует ботулиновый токсин, препятствующий высвобождению медиатора. Транспорт холина через пресинаптическую мембрану (нейрональный захват) угнетается гемихолином. Непосредственное влияние на холинорецепторы оказывают холиномиметики (пилокарпин, цитизин) и холинолитики (М-холиноблокаторы, ганглиоблокаторы и периферические миорелаксанты). Для угнетения фермента ацетилхолинэстеразы могут быть использованы антихолинэстеразные средства (прозерин) [Клиническая биохимия, с. 332].

1.8. КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Кинетика – это учение о влиянии различных факторов на скорость ферментативной реакции. Скорость такой реакции в первую очередь зависит от активности и механизма действия фермента.

Когда количество субстрата не ограничено (значительно больше) по отношению к числу молекул фермента, скорость реакции в этом случае зависит от концентрации субстрата, но не зависит от концентрации фермента. Исходя из теории об образовании в процессе ферментативной реакции промежуточного комплекса между ферментом и субстратом, было введено уравнение, характеризующее зависимость скорости реакции от ряда факторов (уравнение Л. Михаэлиса и М. Ментен):

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}, \quad (1.8.1)$$

где V — скорость реакции при данной концентрации субстрата; S — концентрация субстрата; K_M — константа Михаэлиса-Ментен, моль/л; V_{\max} — максимальная скорость при полном насыщении фермента субстратом.

Таким образом, скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата и степени сродства фермента и субстрата, которую характеризует величина K^{\wedge} . Чем выше эта величина, тем меньше сродства и наоборот [Резяпкин, Бурдь, с. 11].

Если концентрация субстрата велика, а K_M мала, значит, в данном случае фермент полностью насыщен субстратом и при этом скорость ферментативной реакции уже не зависит от концентрации субстрата. Скорость реакции может возрасти только при увеличении концентрации фермента.

Реакции, скорость которых не зависит от концентрации субстрата, получили название реакций нулевого порядка. При низкой концентрации субстрата скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата в каждый данный момент:

$$V = K \cdot [S], \quad (1.8.2)$$

где $[S]$ — молярная концентрация субстрата; K — константа скорости реакции.

Эти реакции называют реакциями первого порядка. В них за каждый равный промежуток времени распадается один и тот же процент оставшегося количества субстрата.

K_m представляет собой концентрацию субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной скорости. Эту величину выражают в молях на литр. На основании уравнения Лайнуивера-Бэрка можно определить K_m :

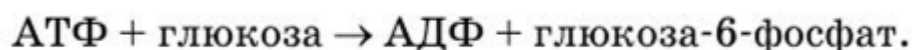
$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}, \quad (1.8.3)$$

где K_m и V_{\max} — постоянные величины при заданных условиях определения; V, S — переменные.

Можно заключить, что при недостатке субстрата скорость ферментативной реакции зависит как от концентрации субстрата, так и от концентрации фермента.

Следует помнить, однако, что в большинстве ферментативных реакций две, а иногда и более различных молекул субстратов вступают в связь с ферментом и участвуют в этой реакции. Например, в реакции, катализируемой гексокиназой [Резяпкин, Бурдь, с. 9].

АТФ и глюкоза являются молекулами-субстратами, а АДФ и глюкоза-6-фосфат являются продуктами этой реакции:



Ферментативные реакции с участием двух субстратов обычно осуществляют перенос атома или функциональной группы от одного субстрата на другой.

В настоящее время данные ферментативной кинетики обрабатывают быстрее и более объективно с помощью вычислительной техники.

Скорость ферментативных реакций может быть изменена под влиянием веществ, называемых ингибиторами. Некоторые из ингибиторов являются ядовитыми, а некоторые при своих токсических свойствах в определенных дозировках могут использоваться в качестве лекарственных средств.

Ингибиторы подразделяются на необратимые и обратимые. Необратимые ингибиторы вступают в связь с ферментом при образовании комплекса, диссоциация которого невозможна. Примером такого ингибитора является диизопропилфторфосфат, известный также как ДФФ. Он ингибирует АХЭ, взаимодействуя с серином, блокируя тем самым действие АХЭ, вследствие чего нарушается способность нейронов проводить нервный импульс. ДФФ является веществом нервнопаралитического свойства, на основе которого создан ряд инсектицидов, относительно нетоксичных для человека и животных.

Обратимые ингибиторы, в свою очередь, легко отделяются от фермента при определенных условиях. Они подразделяются на конкурентные и неконкурентные. Конкурентные ингибиторы являются структурным аналогом субстрата и взаимодействуют с активным центром фермента. При этом ингибитор не вступает в ряд химических превращений. После диссоциации комплекса фермент-ингибитор фермент может либо вступить в связь с субстратом, либо с ингибитором. Поскольку и субстрат, и ингибитор конкурируют за место в активном центре, такое ингибирование называется конкурентным.

Неконкурентные ингибиторы по структуре не сходны с субстратом и при образовании ЕІ взаимодействуют не с активным центром, а с другим участком фермента. Взаимодействие ингибитора с ферментом приводит к изменению структуры последнего. Образование ЕІ-комплекса является обратимым, поэтому после его распада фермент вновь способен атаковать субстрат

Наряду с обратимыми и необратимыми ферментами существуют аллостерические ферменты, имеющие помимо активного центра другой центр,

называемый аллостерическим. С аллостерическим центром связываются вещества, способные изменять активность ферментов, эти вещества называют аллостерическими эффекторами. Эффекторы бывают положительными – активирующими фермент, и отрицательными – ингибирующими, т.е. снижающими активность фермента. Некоторые аллостерические ферменты могут подвергаться действию двух и более эффекторов [Резяпкин, Бурдь, с. 9].

1.9. АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭЗЕРИНА

В работе В.Н. Дубровского и Е.Я. Броквелл описывается влияние различных концентраций эзерина. Авторы проводили исследования на лабораторных крысах-самцах линии Wistar. Животные подвергались декапитации.

Активность АХЭ исследовали путем гомогенизации тканей в смешанной микросомально-митохондриальной фракции. В ходе проведенных авторами исследований было определено, что активность фермента при концентрации выше 10^{-5} М полностью угнеталась. При концентрации ингибитора от 10^{-6} М до 10^{-12} М активность увеличивалась при уменьшении концентрации ингибитора. Максимум активности достигал при концентрации эзерина 10^{-12} М [Дубровский, Броквелл, с. 17]. Таким образом, авторы указывают на дозозависимый рост активности ХЭ от концентрации эзерина в инкубационной среде.

Эзерин и неостигмин инактивируют активный участок АХЭ путем карбамоилирования гидроксильной группы серина. Образующиеся соединения являются замещенными эфирами карбаминовой кислоты, реакция реактивации фермента протекает в замедленном режиме. Эти ХЭ-агенты используются для временного ингибирования эстеразы для пролонгированного действия или усиления эффекта ацетилхолина [Хухо, с. 207].

1.10. НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫЕ ВЛИЯНИЯ АДРЕНОМИМЕТИЧЕСКИХ И ХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ

Исследования, направленные на изучение последствий введения взрослым крысам и крысятам ингибиторов АХЭ, показывают, что у животных возникают нарушения дыхательных функций и нарушения сердечного ритма в совокупности с развивающейся брадикардией. По мере развития ответной реакции у новорожденных крысят возникают периоды асистолии с сохранением сократительной активности предсердий. Это позволяет сделать предположение о том, что клетками-мишенями становятся кардиомиоциты с медленными кальциевыми каналами, а не клетки проводящей системы сердца [Кузнецов, Кузнецова, с. 1075-1085].

Нарушения дыхательного ритма у новорожденных крысят обладают большей длительностью и устойчивостью по сравнению с нарушениями сердечного ритма. В подавляющем количестве случаев причиной смерти животных становится именно апноэ [Кузнецов, Кузнецова, Гайдукова, с. 40].

Медленные кальциевые каналы L-типа располагаются по большей части в кардиомиоцитах и миоцитах сосудистых стенок. В ССС они принимают участие как поддержка электрической и механической активности клеток сердца и сосудов.

Исследование Н.Н. Кузнецова с соавторами показывает на новорожденных крысятах и беременных крысах линии Wistar, что в раннем постнатальном онтогенезе крыс блокада кальциевых каналов L-типа сопровождается брадикардией. Отрицательный хронотропный эффект максимально выражен в первые 24 часа жизни крысят после инъекции им верапамила и, в меньшей степени, нифедипина.

Высокие дозы верапамила провоцируют экстрасистолию, особенно у крысят в возрасте до 16 дней. Препарат замедляет частоту дыхательных движений, вызывая периоды апноэ до полной остановки дыхания. Нифедипин

значительного влияния на дыхательный ритм не оказывает. Характерное для отравления блокаторами АХЭ развитие выраженной тахи-брадикардии сглаживается премедикацией верапамилом. Важным практическим моментом, требующим пристального внимания, является значительно более высокая чувствительность дыхательной системы незрелого животного к высоким дозам верапамила по сравнению с дефинитивным уровнем развития [Кузнецов, Кузнецова, Гайдукова, с. 48-49].

Н.Д. Вдовиченко и О.П. Тимофеева исследовали активность сердечной, дыхательной и моторной активности плодов крыс под действием эзерина. Действие физостигмина проявлялось в виде моторного возбуждения, начинающегося примерно через 90 секунд после введения препарата. Возбуждение проявлялось комплексами генерализованных движений, (состоящих из латеральных и дорзовентральных флексий туловища, сопровождающихся движениями передних конечностей) и одиночными короткими вздрагиваниями тела. Активность становилась непрерывной вне зависимости от сроков гестации [Вдовиченко, Тимофеева, с. 295-298]. Активация начиналась с мощных латеральных флексий туловища, сопровождающихся гипертонусом экстензоров передних конечностей. Затем появлялись глотательные движения и альтернирующие движения передних конечностей, не характерные для интактных плодов, но наблюдаемые авторами ранее после активации катехоламинергической системы введением прекурсора дофамина и норадреналина L-ДОФА [Тимофеева, Вдовиченко, Кузнецов, с. 264-273].

При этом отмечалась обратная зависимость моторной активности и ЧСС. Изменения начинались с мощной децелерации длительностью от 1 до 3 мин, во время которой ЧСС снижалась в 1.5–3 раза. Затем частота сердцебиения несколько возрастала, но оставалась заметно ниже фоновых значений. Децелерации часто были ассоциированы с боковыми флексиями и возникали с постепенно увеличивающимся периодом от 1 до 5 мин [Вдовиченко, Тимофеева, с. 295-298].

В постнатальном периоде после введения препарата наблюдались периоды брадикард с полной остановкой дыхания. У плодов же наблюдается активация дыхания. В старших плодов начиная с 2 минуты после введения физостигмина, проявлялось регулярное ритмичное дыхание длительностью до 20 минут [Вдовиченко, Тимофеева, с. 295-298].

Таким образом, авторы сделали вывод, что уже в онтонатальном периоде у крыс развита чувствительность к применению препаратов, активных в отношении АХЭ-структур. Различия реакций дыхательной системы на эзерин между плодами и новорожденными могут быть связаны как с процессом созревания дыхательного центра и его регуляции, так и со спецификой плодного дыхания [Вдовиченко, Тимофеева, с. 295-298].

Похожее исследование в литературе описано авторами Л.Е. Дмитриевой и В.А. Сизоновым. Авторы исследовали онтогенетическую динамику активности ССС в условиях применения эзерина. Новорожденных и 16-ти дневных крысятах в период созревания помещали в термостатированную камеру, температуру в которой стабильно поддерживали на уровне $28 \pm 0.5^\circ \text{C}$. Авторами было установлено, что у интактных животных в 25% случаев обнаруживается колебание сердечного ритма по брадикардическому типу длиной в несколько секунд, которое не ассоциировано с мышечной активностью [Дмитриева, Сизонов, с. 168-170].

У однодневных крысят инъекция эзерина вызывает две стадии дисфункции сердечных сокращения – стадию брадикардической аритмии и стадию постаритмии. В первой стадии наблюдалось значительное замедление сердечных сокращений с комплексами выраженной брадикардии. Их характерной особенностью являлось максимально низкая величина ЧСС. Во второй стадии размах комплексов уменьшался, а период возникновения составил несколько минут [Динамика становления ритмической активности..., с. 373-378]

Эзерин, введенный суточным крысятам, начинал действовать в течение 3-5 минут. В первой стадии размах комплексов составил около секунды при

длительности 0,5 мин. Во второй стадии размах снижался до 0,3 с, а длительность уменьшалась до 15 с. [Дмитриева, Сизонов, с. 168-170].

Авторы пришли к выводам, что ингибирование АХЭ физостигмином и последующая активация холинореактивных структур сопровождается сходными нарушениями синусового ритма сердца как у новорожденных, так и у 16-ти дневных животных. Вместе с тем, значительные различия в выраженности этих нарушений свидетельствуют о том, что в ранний период постнатального онтогенеза заканчивается созревание холинергических структур, участвующих в регуляции сердечной деятельности [Дмитриева, Сизонов, с. 168-170].

Также в работе А.В. Сизонова с соавторами рассматривается влияние блокады м-холинорецепторов на активность систем новорожденных крысят при активации холинореактивных структур. Ингибирование АХЭ физостигминов и последующая активация холинореактивных структур провоцирует развитие нарушений сердечного ритма, которые у однодневных крысят становятся выраженными примерно спустя 10 мин после введения препарата. Длительность периода максимального эффекта эзерина при этом составила около 20 мин, и в это время авторами наблюдался феномен, который можно обозначить как «стадия брадикардической аритмии». У животных наблюдалось значительное уменьшение частоты сердечного ритма, на фоне которого возникали комплексы еще более выраженной брадикардии, следующие в декасекундном и околominутном ритме [Сизонов, Дмитриева, Кузнецов, с. 179-187].

Характерной особенностью брадикардических комплексов в этот период, как указывают авторы, является то, что при максимально низкой частоте сердцебиений их амплитуда может достигать размера более 1 с (~600–700% по сравнению с фоновым уровнем), так называемые высокоамплитудные комплексы. По окончании периода максимального эффекта у подопытных животных наблюдалась стадия постаритмии, во время которой размах брадикардических комплексов становился меньше [Сизонов, Дмитриева, Кузнецов, с. 179-187].

Эзерин, введенный 16-дневным крысятам, в результате опыта начинал действовать позже, через 12–13 мин. Стадия брадикардической аритмии в 67% случаев полностью отсутствовала, а в остальных случаях укорачивалась [Сизонов, Дмитриева, Кузнецов, с. 179-187].

Блокада М-ХР метацином не приводила к значимым изменениям частоты сердечного ритма и дыхательных движений у крысят обоих возрастов, хотя и авторы наблюдали качественные различия в направленности сдвига частоты дыхательных движений. [Сизонов, Дмитриева, Кузнецов, с. 179-187]

Таким образом, авторами показано, что у крысят в первые 16 суток постнатального онтогенеза изменение уровня активации холинореактивных структур, связанное с блокадой М-ХР и накоплением ацетилхолина вследствие ингибирования АХЭ, приводит к нарушениям функциональной активности сердечно-сосудистой, дыхательной и соматомоторной систем. Имеющиеся возрастные различия связаны со становлением дефинитивного уровня холинергической регуляции. Блокада М-ХР оказывает преимущественное влияние на функциональную активность сердечно-сосудистой системы, предотвращая возникновение выраженных нарушений сердечного ритма, вызванных введением ингибитора холинэстеразы. Премедикация холинолитиком не оказывала влияния на параметры МА, разнонаправленно изменяющейся у 1- и 16-дневных крысят после введения им эзерина [Сизонов, Дмитриева, Кузнецов, с. 179-187]

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе Института биологии ТюмГУ на кафедре анатомии и физиологии человека и животных. Объект исследования – холинэстеразы эритроцитов и плазмы крови крыс линии Wistar.

2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Принцип: измерить количество образовавшегося тиохолина в результате ферментативного гидролиза АТХ. Измерение основано на реакции тиоловой группы с ионом DTNB.

Для измерения количества образовавшегося тиохолина методом измерения активной холинэстеразы по Элману в результате ферментативного гидролиза АТХ предварительно готовят 10 различных концентраций субстрата путем последовательного разведения исходного реактива Элмана дистиллированной водой. Схема разведения: 5 мл реактива Элмана + 5 мл воды, перемешиваем и отбираем 5 мл переносим в другой сосуд и добавляем 5 мл воды и т. д., всего необходимо получить 8 убывающих концентраций включая исходную.

Плазма разводится фосфатным буфером pH8 в 500раз, а повтор антихолинэстеразным препаратом в 1×10^{-8} М в стакане.

Разведенный фермент разливали по 3мл в каждую пробирку. Затем в контрольные пробы приливаем по 200мкл 0,1% антихолинэстеразного препарата. После этого ставим пробирки в водяную баню с интервалом в 15 сек, предварительно добавляя в каждую по 500 мкл реактива Элмана.

Спустя 30 мин с момента внесения реактива Элмана в первую пробирку, пробы снимают с таким же интервалом в 15 сек и приливают в каждую по 200мк

0,1% антихолинэстеразного препарата. Затем все пробы калориметрируют при длине 412нм в кюветах против воды. Если в качестве источника фермента использовали эритроциты пробы нужно предварительно отцентрифугировать при 1500-1700 об/мин в течение 5 минут.

Затем мы выполняли расчет активности. Для каждого раза пробирок мы имеем ext– контрольной пробы (E_k), и ext–опытных проб (E_o), которые в идеале должны быть одинаковыми. Из показаний опытных проб вычисляли среднее арифметическое, а из него вычитали величину экстинкции контрольной пробы. Получаем значение экстинкции, соответствующее количеству окрашенного продукта, образовавшегося в результате действия фермента на субстрат в данной концентрации в течение 30 минут.

ВЫВОДЫ

1. Исследование субстратной специфичности холинэстраз выявило наличие в эритроцитах крыс только ацетилхолинэстеразы. При этом в плазме крови мы отмечаем присутствие около 20% бутирилхолинэстеразной активности.
2. Анализ соотношения величин константы Михаэлиса и максимальной скорости гидролиза субстратов выявил, что холинэстеразы как эритроцитов, так и плазмы крови крыс ингибируются обоими препаратами по конкурентному типу.
3. Анализ величин IC_{50} в целом показывает, что оба использованных антихолинэстеразных препарата обладают большим сродством к ацетилхолинэстеразе эритроцитов крыс, чем к растворимым холинэстеразам плазмы крови.
4. В целом сравнение ингибирующей способности использованных антихолинэстеразных препаратов показало, что наибольшей разницы она достигает при действии на растворимые холинэстеразы плазмы крови крыс при использовании в качестве субстрата ацетилтиохолина.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Anisman H. Neurochemical changes elicited by stress: behavioral correlates. // Psychopharmacology of aversively motivated behavior. Ed. by H. Anisman and G. Bignami. NY.: Plenum press, 1978. P. 119-171.
2. Chatonnet A., Lockrige O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase // Biochem. J. 1989. Vol. 260. Pp. 625–634.
3. Cholinergic mechanism function and dysfunction / Silman I., Michaelson D.M., Fisher A. [et al] // London: CRC Press, 2004. 774 p.
4. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior / Mineur Y.S., Obayemi A., Wigstrand M.B. [et al] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. №110 (9). P. 3573-3578.
5. Delgado P.L. Depression: the case for a monoamine deficiency // J. Clin. Psychiatry. 2000. №61 (suppl. 6). P. 7-11.
6. Delgado P.L., Moreno F.A. Role of norepinephrine in depression // J. Clin. Psychiatry. 2000. №61 (suppl. 1). Pp. 5-12.
7. Dunant Y., Gisiger V. Ultrafast and slow cholinergic transmission. Different involvement of acetylcholinesterase molecular forms // Molecules. 2017. №22 (8). P. 1300.
8. Expression and possible functions of the cholinergic system in a murine embryonic stem cell line / Paraoanu L.E., Steinert G., Koehler A. [et al] // Life Sci. 2007. Vol. 80, № 24–25. Pp. 2375–2379.
9. Gilad M. The stress-induced response of the septo-hippocampal cholinergic system. A vectorial outcome of psychoneuroendocrinological interactions. // Psychoneuroendocrinol. 1987. №12 (3). Pp. 167-184.
10. Henny P., Jones B.E. Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons // European Journal of Neuroscience. 2008. Vol. 27(3). P. 654-670.

11. Higley M.J., Picciotto M.R. Neuromodulation by acetylcholine: examples from schizophrenia and depression // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2014. №29. Pp. 88-95.
12. Hulme E.C., Birdsall N.J., Buckley N.J. Muscarinic receptor subtypes // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 1990. Vol. 30. P. 633-673
13. Komersova A, Komers K, Cegan A. New Findings about Ellman's Method to Determine Cholinesterase Activity// *Zeitschrift fur Naturforschung.* 2007. №62, Pp. 150-154.
14. L-type calcium channel antagonism - Translation from in vitro to in vivo / Fermini B, Ramirez DS, Sun S, [et al]. // *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2017. №84. P. 86-92
15. Mark G.P., Rada P.V., Shors T.J. Inescapable stress enhances extracellular acetylcholine in the rat hippocampus and prefrontal cortex but not the nucleus accumbens or amygdala // *Neurosci.* 1996. №74 (3). P. 767-774.
16. Marnay A., Nachmansohn D. Cholinesterase in voluntary frog's muscle // *The Journal of Physiology.* 1937. Vol. 89(4). P. 359-367
17. Milkani E., Lambert C.R., McGimpsey W.G. Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor // *Anal. Biochem.* 2011. Vol. 408. №2. P. 212-219.
18. Mood and behavioral effects of phy-sostigmine on humans are accompanied by elevations in plasma beta-endorphin and cortisol / Risch S.C., Cohen R.M., Janowsky D.S., Kalin N.H., Murphy D.L. // *Science.* 1980. №209 (4464). Pp. 1545-1546.
19. Moran M.A., Mufson E.J., Gómez-Ramos P. Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Alzheimer's // *Acta Neuropathologica.* 1993. Vol. 85(4). P. 362-369.
20. Most efficient cocaine hydrolase designed by virtual screening of transition states / Zheng F, Yang W, Ko M.C. [et al] // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. №4. P.130.
21. Patrick J., Lindstrom, J. Autoimmuneresponseoacetylcholineereceptor// *Science.* 1973. №180. Pp. 871-872.

22. Perrier A., Massoulié J., Krejci E.. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain // *Neuron*. 2002. Vol. 33(2). P. 275-285.
23. Picciotto M.R., Higley M.J., Mineur Y.S. Acetylcholine as neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior // *Neuron*. 2012. №76 (1). Pp. 116-129.
24. Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse / J. Tomàs, M. M. Santafé, N. Garcia [et al] // *Journal of Neuroscience Research*. 2014. Vol. 92 (5). P. 543-554
25. Sarter M., Parikh V., Howe W.M. Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. №10 (5). P. 383-390.
26. Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance / Iwasaki T., Yoneda M., Nakajima A. [et al]. // *Intern. Med.* 2007. Vol. 46, № 19. Pp. 1633–1639.
27. Stoycheva M., Zlatev R. Bioelectrocatalytical studies of the effect of some pharmaceuticals on the acetylcholinesterase activity // *Electroanalysis*. 1996. V. 8. №7. P. 676-679.
28. Sunanda B.S., Shankaranarayana R., Raju T.R. Restraint Stress-Induced Alterations in the Levels of Biogenic Amines, Amino Acids, and AChE Activity in the Hippocampus // *Neurochem. Res.* 2000. Vol. 25. №12. P. 1547-1552.
29. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26 / Allderdice PW, Gardner HA, Galutira D. [et al]. // *Genomics*. 1991. Vol. 11, №2. Pp. 452-454.
30. The impact of acetylcholinesterase inhibitors on the extracellular acetylcholine concentrations in the adult rat brain: A meta-analysis / Noori H.R., Fliedel S., Brand I., Spanagel R. // *Synapse*. 2012. Vol. 66, №10. P. 893-901
31. Tougu V. Acetylcholinesterase: Mechanism of catalysis and inhibition. A review // *CurrMedChem*. 2001. Vol.1. Pp. 155–170.
32. Viner R. Putting stress in life: Hans Selye and the making of stress theory // *Soc. Stud. Sci.* 1999. №29 (3). Pp. 391-410.

33. Байрамов А.А., Кудрявцева Т.А., Торкунова О.В. Нейрохимические аспекты холинергической модуляции полового поведения при иммобилизационном стрессе // Психофармакология и биологическая наркология. 2006. Т. 6, №1-2. С. 1183-1190.
34. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. М.: Медицина, 2007. 704с.
35. Биохимия человека: в 2-х томах, т.1., пер. с англ. /Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. //М.: Мир, 1993. 384 с.
36. Вдовиченко Н.Д., Тимофеева О.П. Изменения сердечной, дыхательной и моторной активности плодов крыс, вызванные введением ингибитора холинэстеразы эзерина // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2019. №55 (4), с. 295-298.
37. Голиков С.Н., Розенгарт В.И. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. Л.: Медицина, 1962. 260 с.
38. Давлетшина Р.Р., Иванов А.Н., Евтюгин Г.А. Амперометрический ацетилхолинэстеразный сенсор для определения физостигмина // Ученые записки Казанского университета. 2018. Т. 160, кн. 1. С. 5-15.
39. Денисенко П.П. Роль холинреактивных систем в регуляторных процессах. М.: Медицина, 1980. 296 с.
40. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: Пер. с англ. М.: Мир, 1982. 515 с.
41. Динамика становления ритмической активности сердца у плодов и новорожденных крыс / О. П. Тимофеева, Н. Д. Вдовиченко, С. В. Кузнецов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т. 152, № 10. С. 373-378.
42. Дмитриева Л.Е., Сизонов В.А. Нарушения ритма сердца у новорожденных крысят, вызванные инъекцией ингибитора холинэстеразы эзерина // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова с международным участием. 2017. С. 168-170.
43. Драбкина Т.М., Кривой И.И. От разнообразия молекулярных форм к функциональной специализации олигомерных белков. Никотиновый

- холинорецептор, ацетилхолинэстераза и Na^+, K^+ -АТФаза // Цитология. 2004. Т. 46, №2. С. 89-104.
44. Дубровский В.Н., Броквелл Е.Я. Активность ацетилхолинэстеразы коры больших полушарий головного мозга крыс в присутствии различных концентраций эзерина // ACTUALSCIENCE. 2017. Т.3, №3. С. 17
45. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков: Монография. СВИБХБ, 2007. 420 с.
46. Каррер П. Курс органической химии. М.: Государственное научно-техническое издательство химической литературы, 1960. 1216 с.
47. Клиническая биохимия – 2-е изд., испр. и доп. / Бочков В.Н., Добровольский А.Б., Кушлинский Н.Е. [и др.] // М.: ГЭОТАР–МЕД, 2005. 512 с.
48. Клиническая фармакология по Гудману и Гилману. Под общей редакцией А. Г. Гилмана, редакторы Дж. Хардман и Л. Лимберд. Том 1. Пер. с англ. М.: Практика, 2006. 336 с.
49. Кнорре Д.Г. Биологическая химия: Учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов. М.: Высшая школа, 2000. 457 с.
50. Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия: учебник для академического бакалавриата. Под общ. ред. В. П. Комова. 4-е изд., испр. и доп. М.: Издательство Юрайт, 2014. 640 с.
51. Кузнецов С.В., Кузнецова Н.Н. Изменение показателей гемодинамики в раннем постнатальном онтогенезе крыс после инъекции ингибитора холинэстеразы эзерина и при премедикации М- и Н-холинолитиками // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2018. Т. 104. №9. С. 1075-1085.
52. Кузнецов С.В., Кузнецова Н.Н., Гайдукова П.А. Влияние блокады медленных кальциевых каналов L-типа на показатели сердечной, дыхательной и моторной деятельности у интактных и подвергшихся интоксикации эзеринем новорожденных крысят // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2019. Т. 17. №3. С. 39-49.

53. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2017. 1216 с.
54. Нейрохимия: учеб. пособие для вузов / Болдырев А.А., Ещенко Н.Д., Илюха В.А., Кяйвяряйнен Е.И. М.: Дрофа, 2010. 398 с.
55. Неостигмина метилсульфат // РЛС: Регистр лекарственных средств России. URL: rlsnet.ru/active-substance/neostigmina-metilsulfat-1566 (дата обращения: 15.05.2022).
56. Николлс Дж., Мартин Р., Валлас Б. От нейрона к мозгу: пер. с англ. М.: Едиториал УРСС, 2003. 672 с.
57. Петров К.А., Харламова А.Д., Никольский Е.Е. Холинэстеразы: взгляд нейробиолога // Гены и клетки. 2014. Т. 9, № 3. С 160-167.
58. Прозерин // РЛС: Регистр лекарственных средств России. URL: rlsnet.ru/drugs/prozerin-4801 (дата обращения: 15.05.2022).
59. Регуляция мускариновыми рецепторами кальциевого транзientа и синаптической передачи в нервно-мышечном соединении лягушки / Самигуллин Д.В., Хазиев Э.Ф., Ковязина И.В., и др. // Гены и клетки. 2014. Т. 9. № 3-2. С. 242-247.
60. Резяпкин В.И., Бурдь В.Н. Школьные олимпиады "Основы биохимии". Гродно: ГрГУ им. Янки Купалы, 2012. 15 с.
61. Северин Е.С. Биохимия, 2-е изд., испр. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 784 с.
62. Сергеев П.В., Галенко–Ярошевский П.А., Шимановский Н.Л. Очерки биохимической фармакологии, М.: 1996. 541 с.
63. Сизонов В.А., Дмитриева Л.Е., Кузнецов С.В. Влияние блокады м-холинорецепторов на функциональную активность моторной, сердечной и дыхательной систем новорожденных крысят при активации холинореактивных структур // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2019. Т. 55, №3. С. 179-187.
64. Старостина В.К., Дегтярева С.А. Холинэстераза: методы анализа и диагностическое значение: информационно-методическое пособие. Новосибирск: «Вектор-Бест», 2008. 35 с.

65. Степанов В.М. Биохимия и молекулярная биология: учебно-методический комплекс. Горно-Алтайск: РИО ГАГУ, 2009. 94 с.
66. Страйер Л. Биохимия: пер. с англ. в 3 т. Т. 3. М.: Мир, 1985. 400 с.
67. Тимофеева О.П., Вдовиченко Н.Д., Кузнецов С.В. Влияние изменения уровня активности катехоламинергических систем на дыхательную, двигательную и сердечную деятельность у плодов крыс // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2012. №48 (3). С. 264-273.
68. Физостигмин // РЛС: Регистр лекарственных средств России. URL: www.rlsnet.ru/active-substance/fizostigmin-1899 (дата обращения: 15.05.2022).
69. Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов / Бресткин А.П., Кузнецова Л.П., Моралев С.Н. [и др.] // Владивосток: ТИНРО-центр, 1997. 466 с.
70. Ягодина Л.О. Применение метода Элмана для определения кинетических параметров реакции, катализируемой ацетилхолинэстеразой крыс *ratus norvegicus* // Вестник Казанского технологического университета. 2012. №22. С. 241-244.