

На правах рукописи

Силиванова
Елена Анатольевна

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И ВНУТРИМЫШЕЧНОГО
ВВЕДЕНИЯ НЕОСТИГМИНА НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И Na,K-
АТФазы ЭРИТРОЦИТОВ И ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

03.00.04 БИОХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Тюмень

2006

Работа выполнена на кафедре анатомии и физиологии человека и животных
ГОУ ВПО «Тюменский государственный университет»

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Александр Дмитриевич Шалабодов

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Ольга Александровна Русакова

доктор медицинских наук,
профессор

Владимир Георгиевич Соловьев

Ведущая организация

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Защита состоится « 22 » _____ декабря _____ 2006 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.274.07 в ГОУ ВПО «Тюменский государственный университет» по адресу: 625043, г.Тюмень, ул. Пирогова, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Тюменского государственного университета.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2006г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Евгений Александрович Чирятьев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Ацетилхолинэстераза (АХЭ) – фермент гидролиза нейромедиатора ацетилхолина – играет ведущую роль в механизме трансдукции нервного импульса в холинергических синапсах животных (Голиков С.Н., 1964; Маралев С.М., 1999; Taylor P., 1991). Необратимое ингибирование АХЭ нервной системы животных блокирует проведение нервного импульса и вызывает нарушение нормального функционирования организма, приводя в конечном итоге к его гибели (Голиков С.Н., Розенгарт В.И., 1964; Голиков С.Н. и соавт., 1986). Однако роль холинергической системы в организме не ограничивается только медиаторными функциями (Silman I. et al., 2005). Так, показано участие центральных и периферических холинергических систем в высвобождении АКТГ из гипофиза человека (Rich S.C. et al., 1981). Высказывались также предположения о дополнительных некаталитических функциях АХЭ, среди которых указывалось на её участие в развитии и функционировании нейронов благодаря способности влиять на транспорт аминокислот и гидролиз пептидов (Appleyard M.E., 1992; Grisaru D., 1999; Day T., 2002). Весьма вероятным является участие холинергических систем в развитии стресс-реакции (Фурдуй Ф.И. и соавт., 1985; Хайдарлиу С.Х., 1984, 1989).

Na,K-АТФаза – фермент плазматических клеточных мембран, осуществляющий сопряженный с гидролизом АТФ перенос ионов натрия и калия через мембраны против электрохимического градиента (Болдырев А.А., 2001; Skou J.C. et al., 1992; Scheiner-Bobis G., 2002). Благодаря градиенту ионов возбудимые клетки способны кодировать и передавать сигналы, что необходимо для нормального функционирования нервной системы и организма в целом. Таким образом, Na,K-АТФаза играет важную роль в реализации клеточных функций, в связи с чем активность этого фермента подвержена тонкой регуляции со стороны эндокринной и нервной систем.

В связи с вышеизложенным изучение регуляции активности Na,K-АТФазы в условиях стресса и оценка возможного вовлечения холинергических систем в этот процесс может дать дополнительную информацию о механизмах стресс-реакции на молекулярном уровне.

Изучению функциональной связи компонентов холинергической системы и Na,K-АТФазы было посвящено большое количество исследований (Елаев Н.Р., 1980; Елаев Н.Р. и соавт., 1983; Кривой И.И. и соавт., 2003; Кривой И.И. и соавт., 2004;

Stewart D.J., 1981; Busch L., 2004), в которых демонстрировались эффекты ацетилхолина и н-холинорецептора на Na,K-АТФазу. Регуляторная роль компонентов холинергических систем на Na,K-АТФазу может реализовываться также путем их участия в стимуляции выработки эндогенных дигиталис-подобных факторов (ЭДПФ), снижающих активность Na,K-АТФазы (Кривой И.И. и соавт., 2003). Концентрация стероидных соединений, обладающих дигиталис-подобной иммунореактивностью, согласно ряду исследований может возрастать в тканях животных в стрессовых условиях (Kelly R.A. et al., 1985; Lichtstein D. et al., 1985; Hamlyn J.M. et al., 1989; Doris P.A., 1994; Buckalew V.M. et al., 1998; Grambert G. et al., 1998; Hamlyn J.M. et al., 1998 et al.).

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы состояла в исследовании влияния иммобилизации как классического стрессорного раздражителя и внутримышечного введения неостигмина на активность ацетилхолинэстеразы и Na,K-АТФазы.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить маркеры стресс-реакции у крыс после иммобилизационного стресса различной продолжительности и после введения различных доз неостигмина.
2. Оценить состояние периферических и центральных холинреактивных систем у контрольных и опытных животных.
3. Изучить влияние иммобилизационного стресса различной продолжительности на активность Na,K-АТФазы эритроцитов и головного мозга крыс.
4. Изучить активность Na,K-АТФазы эритроцитов и головного мозга крыс после внутримышечного введения различных доз неостигмина.

Положения, выносимые на защиту.

- Острый иммобилизационный стресс и однократное введение неостигмина вызывают сходные изменения маркеров стресс-реакции, однако в случае применения антихолинэстеразного соединения эти изменения более значительны.
- В процессе адаптации животных к иммобилизационному стрессу и после однократного внутримышечного введения животным неостигмина происходит усиление секреторной деятельности надпочечников.

- Острый иммобилизационный стресс приводит к снижению активности Na,K-АТФазы в эритроцитах животных, что связано с присутствием в крови стрессированных животных эндогенных ингибиторов фермента.

- Влияние неостигмина в экспериментах *in vivo* на активность Na,K-АТФазы в эритроцитах и в микросомально-митохондриальных фракциях гомогенатов различных структур головного мозга животных зависит от дозы и режима введения соединения.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы. Установлено, что однократное внутримышечное введение животным антихолинэстеразного соединения в дозах 0,08 мг/кг и 0,25 мг/кг массы тела приводит к более значительному снижению концентрации аскорбиновой кислоты в гомогенате надпочечников по сравнению с действием иммобилизационного стресса. Впервые выявлено увеличение концентрации аскорбиновой кислоты в гомогенате надпочечников после многократного внутримышечного введения животным неостигмина в дозе 0,08 мг/кг массы тела.

Выявлено, что у животных, адаптированных к иммобилизационному стрессу, снижена активность ацетилхолинэстеразы в гомогенате надпочечников и хвостатого тела. При этом обнаружены однонаправленные изменения активности ацетилхолинэстеразы и Na,K-АТФазы в хвостатом теле после адаптации к иммобилизации.

Впервые показано, что внутримышечное введение антихолинэстеразного препарата периферического действия в дозе 0,25 мг/кг массы тела животного вызывает снижение активности Na,K-АТФазы в различных структурах головного мозга. Многократное введение небольшой дозы неостигмина (0,08 мг/кг массы тела) приводит к активации Na,K-АТФазы эритроцитов животных.

Полученные результаты расширяют представление об участии холинергических систем в изменениях, происходящих в организме животных в ходе развития стресс-реакции и адаптации к действию экстремальных факторов.

Результаты исследования используются при проведении спецпрактикума «Кинетика ферментативных реакций» и при чтении спецкурса «Механизмы биохимической адаптации» для студентов, специализирующихся по кафедре анатомии и физиологии человека и животных Тюменского государственного университета.

Апробация диссертации. Основные положения диссертации доложены на V Общероссийской научной конференции "Успехи современного естествознания" (Сочи, 2004), V Общероссийской конференции "Гомеостаз и инфекционный процесс" (Кисловодск, 2004), Всероссийской конференции молодых исследователей "Физиология и медицина" (С.-Петербург, 2005), IX Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "Биология-наука XXI века" (Пущино, 2005), Всероссийской конференции "Менделеевские чтения" (Тюмень, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов и результатов исследований, обсуждения полученных данных, заключения и выводов. Список литературы включает 193 источников, в том числе 114 на иностранных языках. Работа изложена на 126 страницах машинописного текста, иллюстрирована 19 рисунками и 11 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований.

Исследование проводилось на половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 150-200 г. Все животные содержались в стандартных условиях вивария на полноценной диете и были одного возраста. Предварительно оценивали двигательную активность крыс методом «открытого поля» (Меркель А.Л., 1976). Для дальнейших экспериментов использовались только «активные» крысы.

Для исследования иммобилизационного стресса животные были поделены на 4 группы. В первую группу вошли интактные крысы (контроль); во вторую – животные, подвергнутые однократному иммобилизационному стрессу в течение 40 мин (иммобилизация); третью группу составили крысы, адаптированные к повторным воздействиям стресса (адаптация); четвертую – крысы, перенесшие острое стрессорное воздействие после предварительной адаптации (адаптация + иммобилизация). Адаптацию создавали путем повторных сеансов иммобилизации животных в положении на спине. Длительность сеанса в 1-й день составила 15 мин, 2-й – 30 мин, 3-й – 45 мин, 4-й – 1 ч, далее по 1 ч в день через день, всего было 12 сеансов иммобилизации. Забой крыс производили в 3-й группе – на другой день после последнего сеанса, в 4-й – сразу после острого стрессорного воздействия, воспроизводимого через 48 ч после последнего сеанса иммобилизации.

При исследовании воздействия антихолинэстеразного препарата животные также были поделены на 4 группы. Животным первой опытной группы вводили

внутримышечно раствор неостигмина (N-(мета-диметилкарбобоилоксифенил)-триметиламмоний-метилсульфат), приготовленный на 0,9% NaCl, в дозе 0,08 мг/кг массы тела животного однократно. Крысам второй опытной группы неостигмин в такой же дозе вводили по следующей схеме: первые 4 дня ежедневно, затем 8 раз через день (всего 12 раз). Животные третьей группы подвергались однократному действию неостигмина в дозе 0,25 мг/кг массы тела. Крысам контрольной группы вводили равный объем физиологического раствора. Дозы препарата были подобраны в предварительных экспериментах.

Для исследования использовали упакованные эритроциты, полученные из артериально-венозной крови путем отмывки охлажденным 0,145 M NaCl на 10 mM трис-HCl буфере (pH 7,4 при 25°C), и грубую микросомально-митохондриальную фракцию гомогенатов коры головного мозга, мозжечка, хвостатого тела, приготовленных в 9-кратном объеме 0,25 M сахарозы на 0,02 M трис-HCl буфере (pH 7,4 при 25°C), и надпочечников, гомогенизированных в 0,9% NaCl.

Активность Na,K-АТФазы в эритроцитах и гомогенатах рассчитывали по приросту неорганического фосфора (Фн) в присутствии и отсутствие убаина. Содержание неорганического фосфора в пробах определяли методом Чена (Chen P.S. et al., 1957). Для выявления латентной активности фермента эритроциты предварительно инкубировали с 1,5% раствором Твин-20, а гомогенаты головного мозга - с 0,25% раствором дезоксихолата натрия. Стандартная инкубационная среда для определения активности АТФазы содержала в mM: NaCl — 100, KCl — 20, трис-HCl — 50 (pH 7,6 при 25°C), MgCl₂ - 3, ЭДТА — 0,5 и АТФ — 3. При необходимости в условиях эксперимента использовались инкубационные среды с различным содержанием MgCl₂. Активность ацетилхолинэстеразы определяли по методу Элмана и соавт. (Ellman G.L. et al., 1961). Содержание белка в образцах определяли по методу Лоури и соавт. (Lowry O.H. et al., 1951). Определение содержания аскорбиновой кислоты и её окисленных форм (дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот) в надпочечниках проводили модифицированным методом Соколовского с соавт. (Соколовский В.В. и соавт., 1967). Эритроцитометрию проводили путем построения кривых Прайс-Джонса (Кост Е.А., 1975).

Полученные данные были обработаны методами вариационной статистики. Сравнительную оценку полученных результатов проводили с использованием

непараметрического рангового U-критерия Уилкоксона (Манна-Уитни), рекомендованного для малых выборок (Лакин Г.Ф., 1990).

Результаты исследований и их обсуждение.

Определение маркеров стресс-реакции у животных после иммобилизации и внутримышечного введения неостигмина. Содержание аскорбиновой кислоты в надпочечниках животных может быть использовано в качестве маркера стресс-реакции наряду с другими критериями (концентрация кортикостероидов, лейкоформула и др.), поскольку аскорбиновая кислота играет роль кофермента в процессе синтеза катехоламинов (Розен В.Б., 1994) и изменение её концентрации в надпочечниках коррелирует с повышением в плазме крови животных гормонов стресса (Катюхин Л.Н. и соавт., 1984).

Действительно нами обнаружено снижение концентрации аскорбиновой кислоты в надпочечниках животных, подвергнутых иммобилизации в различных режимах (табл. 1), что согласуется с данными Пшенниковой М.Г. и соавт. (1990) о содержании катехоламинов в крови у крыс при остром стрессорном воздействии и адаптации к нему.

Таблица 1

Содержание восстановленной и окисленных форм аскорбиновой кислоты в микросомально-митохондриальной фракции гомогената надпочечников крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу ($M \pm m$, мг%)

Группы животных Формы аскорбиновой кислоты	Контроль (n=10)	Иммобилизация (n=8)	Адаптация (n=6)	Адаптация +иммобилизация (n=6)
Все формы аскорбиновой кислоты	3,85±0,32	2,89±0,26 ^u	1,68±0,27 ^{uu}	2,74±0,62
Аскорбиновая кислота	2,58±0,25	1,59±0,09 ^{uu}	1,06±0,18 ^{uu}	2,29±0,71
Дегидро-аскорбиновая кислота	0,49±0,08	0,51±0,04	0,10±0,02 ^{uu}	0,53±0,01
Дикетогулоновая кислота	0,81±0,15	0,91±0,21	0,62±0,44	0,44±0,09 ^u

Примечание: n – объем выборки; ^u - p<0,05; ^{uu} - p<0,01- уровень достоверности отличий по сравнению с контролем согласно U-критерию Уилкоксона.

Результаты изучения содержания форм аскорбиновой кислоты в надпочечниках крыс, подвергнутых действию неостигмина (табл. 2), указывают на то, что в организме опытных животных в ответ на однократное внутримышечное введение

антихолинэстеразного препарата в дозах 0,08 мг/кг и 0,25 мг/кг массы тела происходят изменения, сходные с изменениями, которые развиваются при классическом стрессе. Более значительное снижение восстановленной формы аскорбиновой кислоты у животных данных групп (на 54,6% и 76,3% относительно контроля соответственно) по сравнению с изменением её содержания у крыс, подвергнутых острому иммобилизационному стрессу (на 38,4% по сравнению с контролем), позволяет предположить, что введение неостигмина животным приводит к более выраженной секреции катехоламинов надпочечниками. У животных после нескольких сеансов иммобилизации обнаружено снижение содержания аскорбиновой кислоты в надпочечниках на 58,9% по сравнению с контролем, в то время как после многократных внутримышечных введений животным неостигмина - увеличение концентрации аскорбиновой кислоты на 32,0% по сравнению с контролем. Данный факт указывает на то, что механизмы реализации стресса в условиях действия антихолинэстеразного соединения и классического стрессового раздражителя могут иметь отличия.

Таблица 2

Содержание восстановленной и окисленных форм аскорбиновой кислоты в микросомально-митохондриальной фракции гомогената надпочечников крыс после внутримышечного введения животным неостигмина ($M \pm m$, мг%)

Доза	0,08 мг/кг массы тела			0,25 мг/кг массы тела		
	Группы животных	Контроль (n=5)	Однократное введение (n=5)	Многократное введение (n=5)	Контроль (n=4)	Однократное введение (n=4)
Формы аскорбиновой кислоты						
Все формы аскорбиновой кислоты	1,62±0,14	1,08±0,11 ^u	2,22±0,23 ^{uu}	2,86±0,13	2,29±0,35 ^u	
Аскорбиновая кислота	0,97±0,09	0,44±0,13 ^u	1,28±0,16 ^u	1,60±0,67	0,38±0,10 ^u	
Дегидро-аскорбиновая кислота	0,42±0,17	0,32±0,11	0,30±0,11	0,18±0,06	0,43±0,13 ^u	
Дикетогулоновая кислота	0,35±0,14	0,37±0,14	0,64±0,14	1,23±0,34	1,04±0,11	

Примечание: n – объем выборки; ^u - p<0,05; ^{uu} - p<0,01 - уровень достоверности отличий по сравнению с контролем согласно U-критерию Уилкоксона.

Исследование активности АХЭ в эритроцитах и в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов надпочечников и головного мозга крыс после иммобилизационного стресса и внутримышечного введения неостигмина.

Для оценки состояния периферической и центральной холинергической системы опытных животных исследовали активность АХЭ в эритроцитах и в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов надпочечников, коры головного мозга, хвостатого тела и мозжечка крысы (табл. 3, 4). Обнаружено, что у животных после нескольких сеансов иммобилизации активность фермента была ниже контрольного значения в хвостатом теле на 15,5%, в надпочечниках – на 24,4% (табл. 4). Эти результаты совместно с данными, полученными при изучении содержания аскорбиновой кислоты в надпочечниках животных, свидетельствуют об активации секреторной деятельности надпочечников у крыс после иммобилизации и в процессе адаптации к иммобилизационному стрессу.

Таблица 3

Активность АХЭ в эритроцитах (мкМ АТХ/мл клеток/ч) и в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов (мкМ АТХ/мг белка/ч) надпочечников и различных структур головного мозга крыс после однократной иммобилизации ($M \pm m$)

	Эритроциты	Надпочечники	Кора головного мозга	Хвостатое тело	Мозжечок
Контроль (n=5)	61,33±8,20	0,89±0,09	2,59±0,23	24,47±1,16	1,02±0,06
Иммобилизация (n=8)	60,46±7,50	1,04±0,10	2,27±0,19	23,24±1,85	1,16±0,09

Таблица 4

Активность АХЭ в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов (мкМ АТХ/мг белка/ч) надпочечников и различных структур головного мозга крыс после адаптации к иммобилизационному стрессу ($M \pm m$)

	Надпочечники	Кора головного мозга	Хвостатое тело	Мозжечок
Контроль (n=5)	0,78±0,07	1,80±0,07	22,23±1,40	0,93±0,06
Адаптация (n=6)	0,59±0,07 ^{uu}	1,59±0,20	18,78±0,58 ^{uu}	0,84±0,05
Адаптация + иммобилизация (n=6)	0,67±0,10	1,80±0,15	20,79±0,81	1,03±0,04

Примечание: n – объем выборки; ^{uu} - $p < 0,01$ – уровень достоверности отличий по сравнению с контролем согласно U-критерию Уилкоксона.

После однократного внутримышечного введения животным неостигмина в дозе 0,08 мг/кг массы тела активность АХЭ в эритроцитах была на 30% ниже по сравнению с контролем (табл. 5), что обусловлено, вероятно, непосредственным взаимодействием специфического ингибитора АХЭ с ферментом эритроцитов.

Активность АХЭ в микросомально-митохондриальной фракции гомогената надпочечников животных, которым однократно вводили неостигмин в дозах 0,08 мг/кг и 0,25 мг/кг массы тела, была ниже контрольного уровня на 52,1% и 58,6% соответственно. После многократных введений антихолинэстеразного соединения в дозе 0,08 мг/кг массы тела изменений активности фермента в микросомально-митохондриальной фракции гомогената надпочечников животных обнаружено не было (табл. 5).

Таблица 5

Активность АХЭ в эритроцитах (мкМ АТХ/мл клеток/ч) и в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов (мкМ АТХ /мг белка/ч) надпочечников и головного мозга крыс после внутримышечного введения неостигмина в разных дозах (M±m)

Доза	0,08 мг/кг массы тела			0,25 мг/кг массы тела	
Группы животных	Контроль (n=5)	Однократное введение (n=5)	Многократное введение (n=5)	Контроль (n=4)	Однократное введение (n=4)
Объект					
Эритроциты	69,03±7,77	48,42±2,77 ^u	83,61±7,72	40,18±6,58	32,41±2,34
Надпочечники	0,48±0,09	0,23±0,02 ^u	0,43±0,03	0,58±0,16	0,24±0,11 ^u
Кора головного мозга	1,85±0,27	1,70±0,27	2,08±0,07	1,09±0,27	0,71±0,09
Мозжечок	1,06±0,17	0,77±0,12	1,24±0,09	0,72±0,14	0,47±0,12
Хвостатое тело	19,52±2,83	16,31±4,41	19,60±3,30	11,71±1,89	11,01±2,25

Примечание: n – объем выборки; ^u - p<0,05 – уровень достоверности отличий по сравнению с контролем согласно U-критерию Уилкоксона.

Таким образом, результаты, полученные при исследовании активности АХЭ и содержания аскорбиновой кислоты в надпочечниках животных, подвергавшихся иммобилизационному стрессу и внутримышечному введению антихолинэстеразного препарата, свидетельствуют о том, что ингибирование АХЭ надпочечников животных неостигмином в экспериментах *in vivo* сопровождается усилением синтетической и/или секреторной деятельности исследованных желез внутренней секреции.

Исследование активности Na,K-АТФазы в эритроцитах и в микросомально-митохондриальных фракциях гомогенатов надпочечников и головного мозга крыс после иммобилизационного стресса.

Ранее было показано, что стрессовые воздействия, и, в частности, иммобилизация, приводят к изменению активности мембранных ферментов, в том числе АХЭ и Na,K-АТФазы (Рожковский Я.В. и соавт., 1991; Медведева И.А. и соавт., 1993). Однако практически отсутствуют данные об активности этих ферментов у животных в процессе адаптации к действию стресс-фактора. Нами проведено исследование активности Na,K-АТФазы в эритроцитах и в различных структурах головного мозга крыс, подвергнутых острому иммобилизационному стрессу, а также адаптации к многократным иммобилизационным воздействиям и стрессированных после предварительной адаптации. Было обнаружено, что активность Na,K-АТФазы в эритроцитах крыс, подвергнутых однократной иммобилизации, была ниже контрольных значений (рис. 1а), а у животных других опытных групп не отличалась от контроля (рис. 1б).

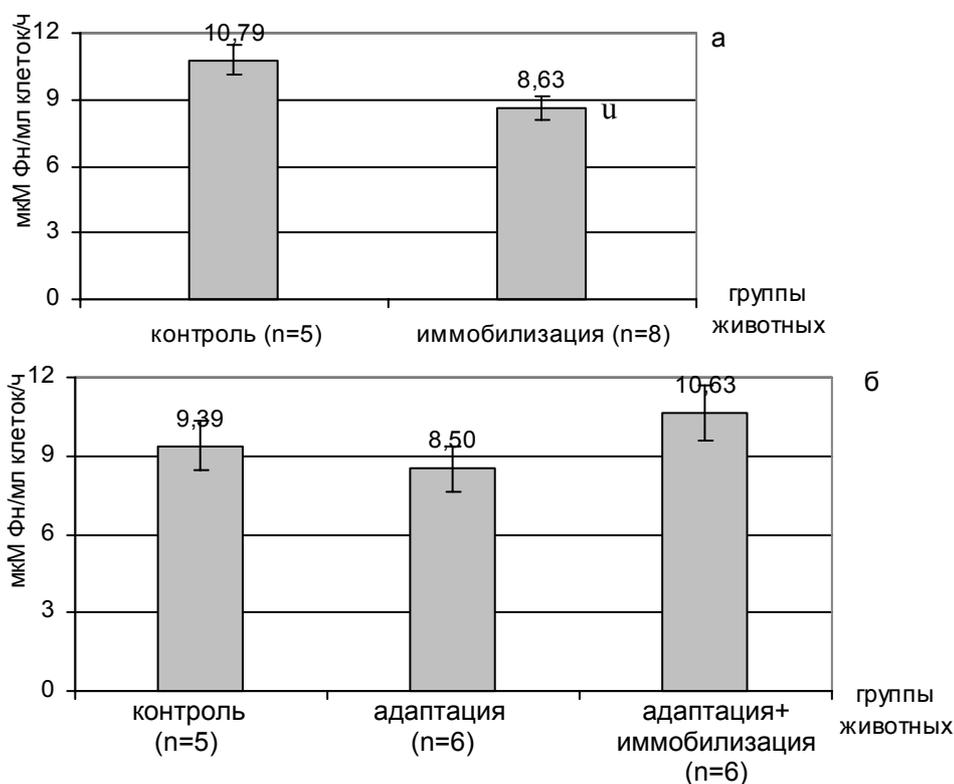


Рис. 1. Активность Na,K-АТФазы в эритроцитах животных, подвергнутых острому иммобилизационному стрессу (а) и адаптации к иммобилизации (б).

Примечание: исследование активности Na,K-АТФазы проводилось в стандартной среде для определения ферментативной активности; n – объем выборки; ^u - p<0,05 – уровень достоверности отличий по сравнению с контролем согласно U-критерию Уилкоксона.

Изменение активности Na,K-АТФазы в эритроцитах крыс, подвергнутых иммобилизации, может быть следствием выброса под действием стресса в периферическую кровь животных депонированных форм эритроцитов,

представленных клетками разной степени зрелости. Долю «молодых» и «старых» форм эритроцитов в периферической крови можно определить на основании процентного соотношения эритроцитов разного диаметра в мазке крови животных, поскольку известно, что старение эритроцитов сопровождается уменьшением их диаметра (Кост Е.А., 1975). Результаты эритроцитометрии, представленные на рис. 2, свидетельствуют о том, что в крови животных, подвергнутых многократным иммобилизационным воздействиям и стрессу после предварительной адаптации, преобладали эритроциты меньшего диаметра, чем в контроле (рис. 2).

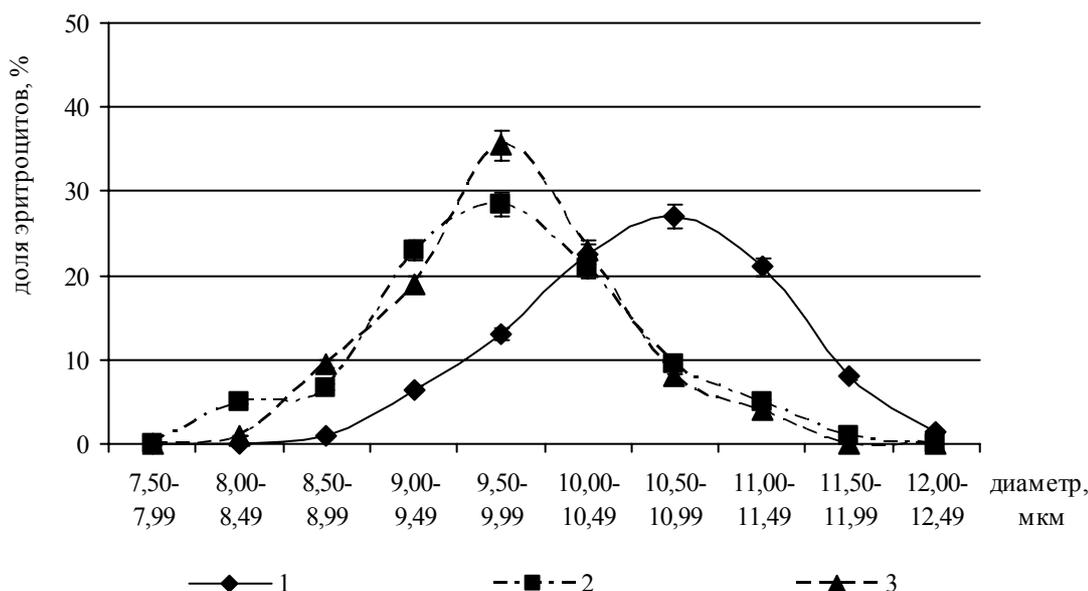


Рис. 2. Кривая распределения эритроцитов по диаметру в мазке крови животных.

Примечание: группы животных: 1 – контроль (n=10), 2 – адаптация (животные после нескольких сеансов иммобилизации, n=6), 3 – адаптация+иммобилизация (животные, стрессированные после предварительной адаптации, n=6).

В ряде работ было показано, что при старении эритроцитов происходит снижение активности мембранных ферментов, в том числе Na,K-АТФазы и АХЭ (Камышенцев М.В. и соавт., 1976; Медведева И.А. и соавт., 1993). Как показали наши исследования, в эритроцитах животных, подвергнутых однократной иммобилизации, активность Na,K-АТФазы была ниже контрольного уровня, а активность АХЭ не отличалась от контроля. Можно предположить, что обнаруженное снижение активности Na,K-АТФазы в эритроцитах животных, подвергнутых острому иммобилизационному стрессу, обусловлено не только выбросом в периферическую кровь «старых» эритроцитов, но и может быть связано с увеличением в плазме крови стрессированных животных концентрации эндогенных дигиталис-подобных

факторов (ЭДПФ) (Lichtstein D. et al., 1985; Buckalew V.M. et al., 1998;), которые являются ингибиторами Na,K-АТФазы (Therien A. et al., 2000).

Для проверки данного предположения было исследовано влияние плазмы крови животных, подвергнутых острому иммобилизационному стрессу, на активность Na,K-АТФазы микросомально-митохондриальной фракции гомогената коры головного мозга крыс. Выявлено снижение активности фермента в микросомально-митохондриальной фракции коры головного мозга контрольных животных после инкубации с плазмой крови стрессированных крыс (рис. 3), что позволяет предположить присутствие в крови крыс, подвергнутых острому иммобилизационному стрессу, факторов, ингибирующих Na,K-АТФазу.

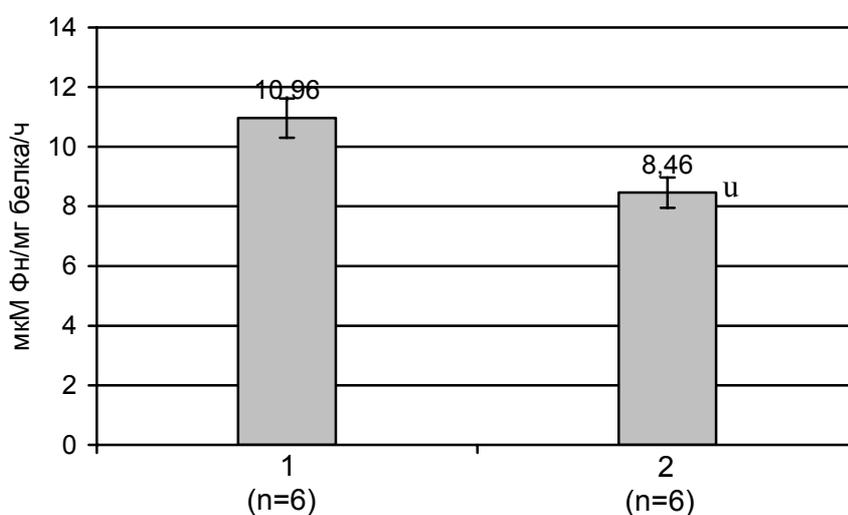


Рис. 3. Активность Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогената коры головного мозга крыс контрольной группы после инкубации с плазмой крови контрольных (1) и стрессированных (2) животных.

Примечание: исследование активности Na,K-АТФазы проводилось в стандартной среде для определения ферментативной активности; n – объем выборки; ^u - $p < 0,05$ – уровень достоверности отличий по сравнению с контролем согласно U-критерию Уилкоксона.

В результате исследования активности Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов различных структур головного мозга крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу, было обнаружено, что в хвостатом теле животных после нескольких сеансов иммобилизации (группа адаптации) активность фермента была достоверно ниже контрольных значений на 20,2% (табл. 6), а в мозжечке и коре головного мозга не отличалась от контроля.

Таблица 6

Активность Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов (мкМ Фн/мг белка/ч) различных структур головного мозга крыс после адаптации к иммобилизационному стрессу ($M \pm m$)

Объект \ Группы животных	Контроль (n=5)	Адаптация (n=6)	Адаптация+ иммобилизация (n=6)
Кора головного мозга	9,99±1,12	7,46±1,55	8,54±1,02
Мозжечок	5,06±0,95	5,68±0,93	6,17±0,15
Хвостатое тело	10,80±1,28	8,62±0,49 ^{uu}	11,78±0,28

Примечание: n – объем выборки; ^{uu} - $p < 0,01$ – уровень достоверности отличий по сравнению с контролем согласно U-критерию Уилкоксона.

Известно, что важная роль в функционировании Na,K-АТФазы принадлежит ионам магния, которые участвуют в образовании субстрата Mg-АТФ и способны разобщать протомеры фермента в ходе реакционного цикла (Болдырев А.А и соавт. 1989; Bonting et al., 1983). Кроме того, ионы магния обладают мембранотропными эффектами, влияя на фазовые переходы мембранных липидов (Болдырев А.А. и соавт., 1990; Кравцов А.В. и соавт., 2001).

Характер кривых зависимости активности Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогената хвостатого тела от содержания $MgCl_2$ в среде определения ферментативной активности в контроле и в опыте был одинаковым (рис. 4). Следовательно, способность фермента переходить из олигомерной формы в протомерную у опытных животных не изменялась. Вместе с тем активность Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогената хвостатого тела крыс, подвергнутых нескольким сеансам иммобилизации, была ниже контрольных значений при определении активности в средах, содержащих 6 мМ и 12 мМ $MgCl_2$, на 27,7% и 19,4% соответственно (рис. 4). Можно предположить, что изменение активности Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогената хвостатого тела крыс после нескольких сеансов иммобилизации обусловлено связыванием с молекулой фермента факторов, снижающих её активность. В ряде исследований было показано существование в головном мозге животных ЭДПФ, которые, как известно, ингибируют Na,K-АТФазу (Haber E. et al., 1987; Sancho J.M., 1998; Van Huysse J.W. et al., 1998; Lichtstein D. et al., 2001).

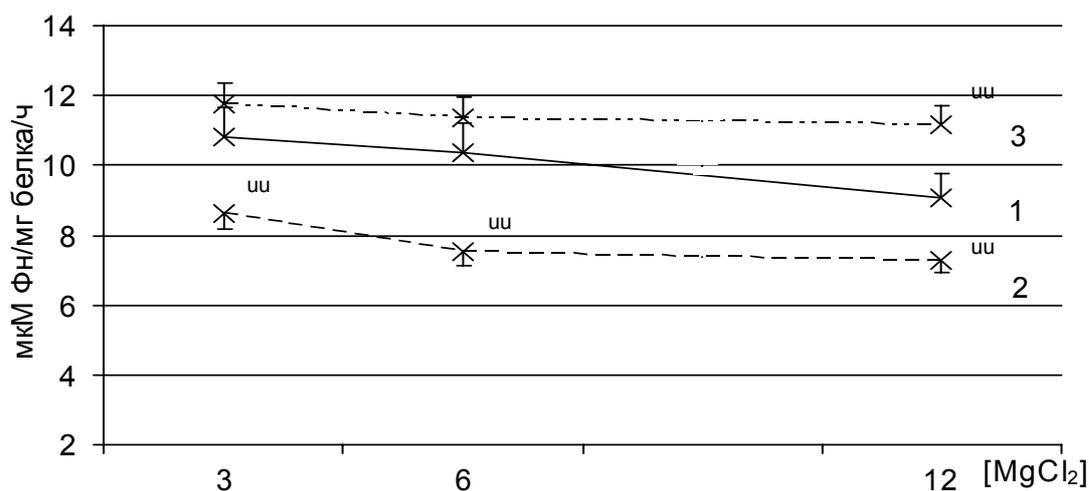


Рис. 4. Зависимость активности Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогената хвостатого тела от концентрации $MgCl_2$ в среде определения ферментативной активности.

Примечание. Группы животных: 1 – контроль, 2 – адаптация (животные после нескольких сеансов иммобилизации), 3 – адаптация+иммобилизация (животные, стрессированные после предварительной адаптации). ^{uu} – $p < 0,01$ – уровень достоверности отличий по сравнению с контролем согласно U-критерию Уилкоксона.

Интересно отметить, что у животных, стрессированных после предварительной адаптации, активность Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогената хвостатого тела была достоверно выше контрольного уровня на 23,3% только в среде определения ферментативной активности, содержащей 12 мМ $MgCl_2$ (рис. 4).

Обращает на себя внимание тот факт, что у животных после нескольких сеансов иммобилизации активность АХЭ и Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов мозжечка и коры головного мозга не отличалась от контроля, в то время как в хвостатом теле опытных животных обнаружены однонаправленные изменения активности исследованных ферментов, что может быть связано с наибольшей представленностью холинергической системы в хвостатом теле по сравнению с другими структурами головного мозга (Чернышевская И.А., 1983).

Исследование активности Na,K-АТФазы в эритроцитах и в микросомально-митохондриальных фракциях гомогенатов головного мозга крыс после внутримышечного введения различных доз неостигмина.

Согласно исследованиям Кривого И.И. и соавт. (2003; 2004) Na,K-АТФаза может находиться под холинергическим контролем и/или контролем ЭДПФ.

Специфическую активацию холинергических систем можно вызвать введением животным веществ, избирательно ингибирующих ацетилхолинэстеразу. Отмечено, что в ответ на введение животным антихолинэстеразных препаратов повышается концентрация эндогенного ацетилхолина, который способен стимулировать высвобождение из надпочечников кортикостероидов и других гормонов (Ажипа Я.И., 1981). Поскольку пути метаболизма ЭДПФ и гормонов надпочечников могут быть тесно взаимосвязаны (Doris P.A. et al., 1989; Shaikh I.M. et al., 1991; Hamlyn J.M. et al., 1998; Lichtstein D. et al., 1998), можно предполагать, что синтез и/или секреция ЭДПФ возрастает при активации холинергической системы надпочечников. В связи со сказанным в данной работе использовался антихолинэстеразный препарат преимущественно периферического действия с целью специфической активации холинреактивных систем периферических желез и, в частности, коры надпочечников.

В ходе исследований было обнаружено, что активность Na,K-АТФазы в эритроцитах после однократного внутримышечного введения животным неостигмина в дозе 0,08 мг/кг массы тела не отличалась от контрольных значений, а после многократного введения неостигмина в такой же дозе была выше контрольного уровня в среднем на 30% при всех концентрациях MgCl₂ в среде определения ферментативной активности (табл. 7). После однократного введения животным антихолинэстеразного соединения в дозе 0,25 мг/кг массы тела изменений активности фермента в эритроцитах по сравнению с контролем выявлено не было (табл. 7).

Таблица 7

Активность Na,K-АТФазы в эритроцитах (мкМ Фн/мл клеток/ч) крыс после внутримышечного введения неостигмина (M±m)

Доза	0,08 мг/кг массы тела			0,25 мг/кг массы тела	
	Контроль (n=5)	Однократное введение (n=5)	Многократное введение (n=5)	Контроль (n=4)	Однократное введение (n=4)
3	5,97±0,56	7,13±0,61	7,59±0,79 ^u	9,49±0,28	9,30±0,70
6	5,26±0,58	6,22±0,52	7,13±0,39 ^{uu}	9,21±0,50	8,26±0,42
12	5,18±0,60	6,15±0,52	6,64±0,72 ^{uu}	7,40±0,84	8,26±0,57

Примечание: n – объем выборки; ^u – p<0,05, ^{uu} – p<0,01 – уровень достоверности отличий по сравнению с контролем согласно U-критерию Уилкоксона.

Известно, что активность мембранных ферментов в эритроцитах разной степени зрелости неодинакова (Камышенцев М.В. и соавт., 1976; Медведева И.А. и соавт., 1993). Для определения доли «молодых» и «старых» эритроцитов в периферической крови животных после внутримышечного введения неостигмина строили кривые Прайс-Джонса, отражающие распределение эритроцитов в мазке крови животных по диаметру (рис. 5).

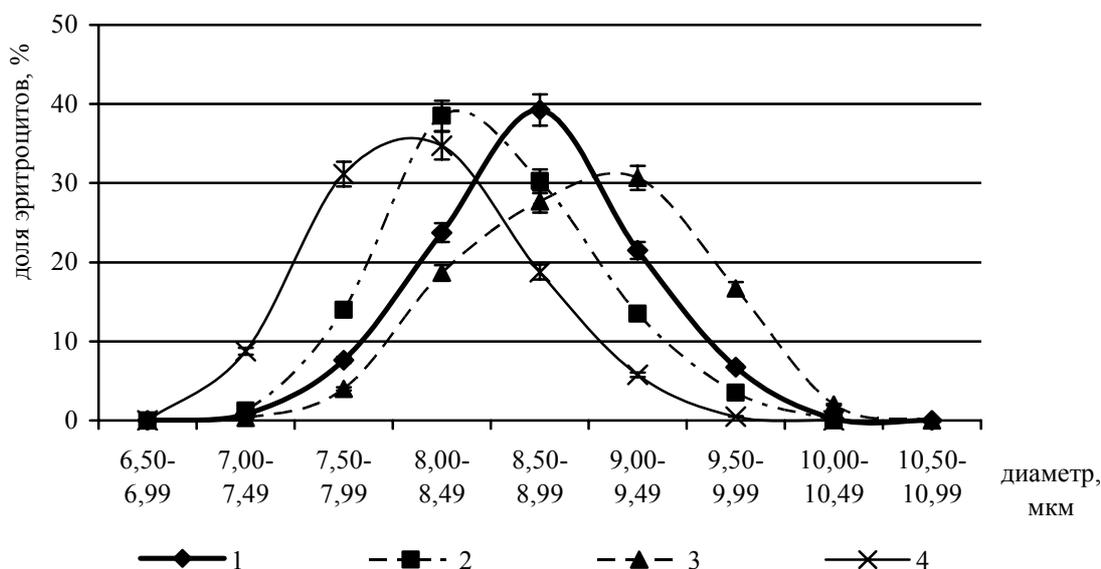


Рис. 5. Кривая распределения эритроцитов по диаметру в мазке крови животных после внутримышечного введения неостигмина.

Примечание. Группы животных: 1 – контроль (n=9), 2 – однократное введение неостигмина в дозе 0,08 мг/кг массы тела (n=5), 3 – многократное введение неостигмина в дозе 0,08 мг/кг массы тела (n=5), 3 – однократное введение неостигмина в дозе 0,25 мг/кг массы тела (n=4).

Из рисунка 5 видно, что после однократного внутримышечного введения животным неостигмина в дозах 0,08 мг/кг и 0,25 мг/кг массы тела средний диаметр эритроцитов в мазке крови уменьшился, в то время как после многократного введения препарата в дозе 0,08 мг/кг массы тела – увеличился. Результаты эритроцитометрии свидетельствуют о преобладании в крови животных после однократного введения неостигмина «старых» форм эритроцитов, а после многократного введения – зрелых и более «молодых» эритроидных клеток, чем и обусловлено выявленное нами повышение активности Na,K-АТФазы в эритроцитах крыс после многократного введения неостигмина в дозе 0,08 мг/кг массы тела. Скорее всего, появление в крови животных данной опытной группы «молодых» эритроцитов связано с активацией эритропоэза (Цейликман В.Э. и соавт., 1995).

Следующий этап работы заключался в исследовании активности Na,K-АТФазы в различных структурах головного мозга животных после внутримышечного введения различных доз антихолинэстеразного соединения. Было выявлено достоверное ингибирование Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов коры головного мозга, мозжечка и хвостатого тела животных после однократного введения неостигмина в дозе 0,25 мг/кг массы тела в среднем на 26%, 35% и 18% соответственно по сравнению с контролем при всех концентрациях $MgCl_2$ в среде определения ферментативной активности (табл. 8).

Таблица 8

Активность Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов (мкМ Фн/мг белка/ч) различных структур головного мозга крыс после внутримышечного введения неостигмина в дозе 0,25 мг/кг массы тела ($M \pm m$)

[$MgCl_2$], ммоль/л	Контроль (n=4)			Однократное введение (n=4)		
	Кора головного мозга	Мозжечок	Хвостатое тело	Кора головного мозга	Мозжечок	Хвостатое тело
3	13,76±0,31	8,60±0,90	10,92±0,68	9,96±0,67 ^{uu}	5,77±0,50 ^u	8,68±0,28 ^{uu}
6	13,21±0,27	9,11±0,91	10,20±0,57	10,18±0,80 ^{uu}	5,84±0,57 ^u	8,60±0,39 ^u
12	12,15±0,64	7,50±1,10	9,02±0,61	8,79±0,56 ^{uu}	4,69±0,46 ^u	7,60±0,39 ^u

Примечание: n – объем выборки; ^u – $p < 0,05$, ^{uu} – $p < 0,01$ – уровень достоверности отличий по сравнению с контролем согласно U-критерию Уилкоксона.

Обнаруженное снижение активности Na,K-АТФазы может быть связано с изменением физико-химических характеристик мембраны нервных клеток. Известно, что изменение состояния липидного бислоя влияет на способность Na,K-АТФазы переходить из олигомерной формы в протомерную (Болдырев А.А. и соавт., 1989; Болдырев А.А., 2001). Результаты изучения активности Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов различных структур головного мозга в зависимости от содержания $MgCl_2$ в среде определения ферментативной активности указывают на то, что способность фермента переходить в потомерную форму у опытных животных не отличалась от контроля (табл. 8). Следовательно, можно предположить, что физико-химические характеристики мембран клеток головного мозга животных после однократного введения неостигмина в дозе 0,25 мг/кг массы тела не изменялись. Косвенным доказательством этого утверждения могут служить результаты изучения активности

другого мембранного фермента – АХЭ – в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов коры головного мозга, мозжечка и хвостатого тела опытных животных. Какие-либо нарушения липидного матрикса мембраны нервных клеток привели бы к снижению активности АХЭ, однако согласно полученным результатам активность данного фермента в головном мозге животных после введения неостигмина в дозе 0,25 мг/кг массы тела не изменялась.

Другой причиной выявленного изменения активности Na,K-АТФазы в головном мозге может являться повышение содержания в организме опытных животных эндогенных ингибиторов (Buckalew V.M. et al., 1998; Hamlyn J.M. et al., 1998; Lichtstein D. et al., 2001). Необходимо отметить, что снижение активности Na,K-АТФазы в головном мозге животных после внутримышечного введения неостигмина в дозе 0,25 мг/кг массы тела отмечено нами на фоне ингибирования АХЭ надпочечников опытных животных. В этих условиях, вероятно, произошло накопление эндогенного ацетилхолина, под действием которого усилился синтез катехоламинов в коре надпочечников и, возможно, ЭДПФ, метаболизм которых связан с гормонами надпочечников (Lichtstein D. et al., 1998; Hamlyn J.M. et al., 1998 et al.). Подтверждением увеличения синтеза катехоламинов у животных, которым вводился неостигмин в дозе 0,25 мг/кг массы тела, является резкое снижение восстановленной формы аскорбиновой кислоты в гомогенате надпочечников животных этой группы.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружены сходные изменения в содержании аскорбиновой кислоты в надпочечниках крыс после острого иммобилизационного стресса и адаптации к многократным иммобилизационным воздействиям и после однократного внутримышечного введения неостигмина в дозах 0,08 мг/кг и 0,25 мг/кг массы тела. После многократных внутримышечных введений животным неостигмина в дозе 0,08 мг/кг массы тела выявлено увеличение концентрации восстановленной формы аскорбиновой кислоты в надпочечниках на 32,0% по сравнению с контролем.

2. Показано, что многократные иммобилизационные воздействия и однократное внутримышечное введение животным неостигмина в дозах 0,08 мг/кг и 0,25 мг/кг массы тела вызывали снижение активности АХЭ в микросомально-митохондриальной фракции гомогената надпочечников крыс, что совместно с результатами по изучению содержания аскорбиновой кислоты в надпочечниках свидетельствует об усилении секреторной деятельности исследованных желез

внутренней секреции в процессе адаптации животных к иммобилизационному стрессу и при специфической активации холинергической системы надпочечников.

3. Выявлено снижение активности Na,K-АТФазы в эритроцитах крыс, подвергнутых острому иммобилизационному стрессу, на 20% по сравнению с контролем, при этом плазма крови стрессированных животных ингибировала Na,K-АТФазу микросомально-митохондриальной фракции коры головного мозга контрольных крыс на 22,8%. Адаптация к повторным иммобилизационным воздействиям приводила к снижению активности Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции хвостатого тела животных.

4. После однократного внутримышечного введения животным неостигмина в дозе 0,25 мг/кг массы тела обнаружено достоверное снижение активности Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции гомогенатов хвостатого тела, мозжечка и коры головного мозга на 20,5%, 32,9% и 27,6% соответственно по сравнению с контролем.

5. Совокупность полученных результатов позволяет предположить присутствие в крови животных после острого иммобилизационного стресса и в головном мозге животных после введения неостигмина в дозе 0,25 мг/кг массы тела факторов, ингибирующих Na,K-АТФазу.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дубровский В.Н., Кыров Д.Н., Силиванова Е.А., Шалабодов А.Д. Активность АХЭ и Na,K-АТФазы эритроцитов и грубой микросомально-митохондриальной фракции головного мозга крыс при остром иммобилизационном стрессе // Материалы V Общероссийской конференции "Гомеостаз и инфекционный процесс" г. Кисловодск, 19-21 апреля 2004 г. - Фундаментальные исследования. – 2004. - №1. - С. 51.

2. Дубровский, В.Н., Кыров Д.Н., Силиванова Е.А., Шалабодов А.Д. Активность Na⁺,K⁺-АТФазы и ацетилхолинэстеразы в различных отделах головного мозга крыс при иммобилизационном стрессе различной продолжительности // Материалы V Общероссийской научной конференции "Успехи современного естествознания" г. Сочи, 27-29 сентября 2004 г. - Успехи современного естествознания. – 2004. - №8. - С.41-42.

3. Дубровский, В.Н., Кыров Д.Н., Силиванова Е.А., Шалабодов А.Д. Активность ацетилхолинэстеразы и содержание аскорбиновой кислоты в

надпочечниках крыс при адаптации к иммобилизационному стрессу // Материалы II конференции "Фундаментальные и прикладные исследования в медицине" о. Крит, 3-10 октября 2004 г. - Фундаментальные исследования. – 2004. - №5. - С.108.

4. Дубровский В.Н., Кыров Д.Н., Силиванова Е.А. Активность Na,K-АТФазы и ацетилхолинэстеразы в надпочечниках и различных регионах головного мозга крыс при иммобилизационном стрессе различной продолжительности // Сборник материалов Всероссийской конференции молодых исследователей "Физиология и медицина" г. Санкт-Петербург, 14-16 апреля 2005 г. - Приложение к журналу "Вестник молодых ученых" (Серия "Науки о жизни"). – 2005. - С. 36.

5. Силиванова Е.А., Кыров Д.Н., Шалабодов А.Д. Регуляция активной Na,K-АТФазы головного мозга и эритроцитов крыс при стрессе // Материалы IX Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология-наука XXI века" г.Пущино, 18-22 апреля 2005 г. - С.95.

6. Дубровский В.Н., Кыров Д.Н., Силиванова Е.А., Шалабодов А.Д. Активность Na,K - АТФазы головного мозга и эритроцитов крыс при стрессе // Материалы Всероссийской конференции "Менделеевские чтения" г. Тюмень, 26-28 мая 2005 г. - С.126-129.

7. Силиванова Е.А., Кыров Д.Н., Дубровский В.Н., Шалабодов А.Д. Активность Na,K-АТФазы эритроцитов и различных регионов головного мозга крыс при ингибировании ацетилхолинэстеразы разными дозами неостигмина // Вестник Тюменского государственного университета. – 2006. - №5. – С.12-20.

Силиванова Елена Анатольевна

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И ВНУТРИМЫШЕЧНОГО
ВВЕДЕНИЯ НЕОСТИГМИНА НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И Na,K-
АТФазы ЭРИТРОЦИТОВ И ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

03.00.04 БИОХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать _____ . Тираж _____ экз.
Объем _____ уч.-изд. л. Формат _____. Заказ _____.

Издательство Тюменского государственного университета

625000, г. Тюмень, ул. Семакова, 10.

Тел./факс (3452) 45-56-60, 46-27-32

E-mail: izdatelstvo@utmn.ru