

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

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ
Кафедра экологии и генетики

Заведующий кафедрой
д-р биол. наук, профессор
И.В. Пак

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

магистра

**АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ
В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ КРЫС ЛИНИИ W1STAR, ПОДВЕРГНУТЫХ
ДЕЙСТВИЮ СТРЕССА И ОБРАБОТАННЫХ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫМ
ПРЕПАРАТОМ**

06.04.01 Биология

Магистерская программа «*Экологическая генетика*»

Выполнила работу
студентка 2 курса
очной формы обучения

Сокол Александра Михайловна

Научный руководитель
к.б.н., доцент

Дубровский Виталий Николаевич

Рецензент
к.б.н., доцент, Тюменский
государственный университет

Кыров Дмитрий Николаевич

Тюмень
2020

АННОТАЦИЯ

с. 59, рис.7, табл.1, библи. 74

Изучена зависимость активности АХЭ крыс от концентрации физостигмина(эзерина) и прозерина. Выявлена активность аскорбиновой кислоты в надпочечниках крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами. Определена активность АХЭ и БуХЭ в ЦНС, а именно в коре больших полушарий и хвостатом теле, а также активность АХЭ и БуХЭ в цельной крови, эритроцитах и надпочечниках.

Показано, что эзерин и прозерин эффективны в относительно низких концентрациях. Содержание аскорбиновой кислоты в надпочечниках крыс, подвергнутых действию стресса ниже, чем в контрольной группе животных. Повышение активности холинэстераз выявлено в эритроцитах крыс в группе животных, подвергнутых действию стресса без введения антихолинэстеразных препаратов. Снижение активности холинэстераз наблюдалось в смешанной мембранной фракции надпочечников и хвостатого тела крыс в группе животных, подвергнутых действию стресса предварительно обработанных эзеринем, в сравнении с контролем. В остальных исследуемых тканях различий активности холинэстераз у крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразным препаратом в сравнении с контролем не выявлено.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза, активность, стресс, физостигмин, прозерин, кора больших полушарий, хвостатое тело, надпочечники, цельная кровь, эритроциты.

The dependence of rats AChE activity on the concentration of physostigmine (eserin) and proserin was studied. The activity of ascorbic acid in the adrenal glands of rats exposed to stress and treated with anticholinesterase drugs was revealed. The activity of AChE and BChE in the central nervous system, namely, in the cerebral cortex and caudate nucleus, as well as the activity of AChE and BChE in whole blood, red blood cells and adrenal glands, was determined.

It has been shown that eserine and proserin are effective in relatively low concentrations. The amount of ascorbic acid in the adrenal glands of rats subjected to stress is lower than in the control group of animals. An increase in cholinesterase activity was detected in rat erythrocytes in the group of animals subjected to stress without administration of anticholinesterase drugs. A decrease in cholinesterase activity in the mixed membrane fraction of the adrenal gland and caudate nucleus of rats was observed in the group of animals subjected to stress and pretreated with eserine, compared with the control. In the remaining tissues studied, differences in the activity of cholinesterase in rats subjected to stress and treated with an anticholinesterase drug were not detected in comparison with the control.

Key words: acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, activity, stress, physostigmine, proserin, cerebral cortex, caudate nucleus, adrenal glands, whole blood, red blood cells.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1.АЦЕТИЛХОЛИН КАК НЕЙРОМЕДИАТОР. ХОЛИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА.....	8
1.2.ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЙ СИНАПС.....	11
1.3.АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ	13
1.4.ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ: КЛАССИФИКАЦИЯ, ФУНКЦИИ, СВОЙСТВА.....	18
1.5.МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ ХОЛИНЭСТЕРАЗ.....	23
1.6.ИНГИБИРОВАНИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗ. ХАРАКТЕРИСТИКА ИНГИБИТОРОВ	25
1.7.СТРЕСС.	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	52
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	53

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DTNB – 5,5- дитио-bis- 2- нитробензойная кислота

АКТ - активность

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АТХ - ацетилтиохолин

АХ – ацетилхолин

АХР – ацетилхолиновые рецепторы

АХЭ – ацетилхолинэстераза

БуТХ – бутирилтиохолин

БуХЭ – бутирилхолинэстераза

ВНС – вегетативная нервная система

ВПСП – возбуждающий потенциал действия

К – контрольная группа

КБП – кора больших полушарий

мХР – мускариновые ацетилхолиновые рецепторы

НП – надпочечники

нХР – никотиновые ацетилхолиновые рецепторы

ПНС – периферическая нервная система

С – группа, подвергнутая стрессу (плавание)

СП – группа, обработанная антихолинэстеразным препаратом

ТПСП - тормозящий потенциал действия

ФБ – фосфатный буфер

ФЭК – Фотоэлектрический колориметр

ХТ – хвостатое тело

ХЭ - холинэстеразы

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЦК – цельная кровь

ЦНС – центральная нервная система

Э – эритроциты (упакованные)

П - плазма крови

ВВЕДЕНИЕ

Холинергическая система широко представлена в различных отделах нервной системы и имеет большое значение для когнитивных процессов, памяти и обучения, локомоторной функции, в частности создания двигательных стереотипов, регулирует уровень бодрствования. Медиатором для холинергических синапсов является ацетилхолин. Он является единственным нейротрансмиттером в соматической нервной системе, ответственной за двигательную функцию, и одним из ключевых веществ в деятельности вегетативной нервной системы. Знание медиаторов, участвующих в функционировании синапса, и механизма их действия является центральным моментом для понимания деятельности мозга и нервной системы в целом.

Холинэстеразы - это группа ферментов, ответственная за гидролиз ацетилхолина до уксусной кислоты и холина. Эта реакция лежит в основе передачи нервного импульса, т.к. приводит к деполяризации постсинаптической мембраны и запускает деполяризационную волну по электрически возбудимой мембране нервной клетки. Ингибирование этой группы ферментов влечет за собой повышение уровня АХ в синаптической щели. Ингибиторы холинэстераз широко применяются в практической медицине при поражениях периферической нервной системы и нарушениях памяти, болезни Альцгеймера, ишемического инсульта, миастении, параличах и парезах, глаукоме и др. Физостигмин может улучшать выполнение задач на обучение и память и восстанавливать некоторые дефекты, возникшие вследствие повреждения базальных ядер.

Стресс – это неспецифическая реакция адаптации (сохранения гомеостаза) организма при воздействии неблагоприятных условий, вызванных как физическими, так и психологическими факторами.

Цель:

Исследовать активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в различных тканях крыс линии Wistar, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразным препаратом.

Задачи:

1. Определить концентрацию аскорбиновой кислоты в надпочечниках крыс, подвергнутых действию стресса предварительно обработанных и необработанных антихолинэстеразным препаратом
2. Исследовать диапазон эффективных концентраций антихолинэстеразного препарата - эзерина для холинэстераз эритроцитов крыс.
3. Определить скорость гидролиза ацетилхолина холинэстеразами различных отделов головного мозга, а также системы крови и надпочечников крыс, подвергнутых действию стресса предварительно обработанных и необработанных антихолинэстеразным препаратом.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. АЦЕТИЛХОЛИН КАК НЕЙРОМЕДИАТОР.

ХОЛИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА

Нейромедиаторы, или нейротрансмиттеры- это неоднородные по химическому строению вещества синтезируемые нейронами, объединенные в этот класс по своей функции. Они обеспечивают передачу нервного импульса от нейрона к нейрону или исполнительному органу в результате взаимодействия со специфическими рецепторами, расположенными на постсинаптической мембране синапса, вследствие чего способны изменять мембранный потенциал клетки [Белова Е.И. с.4,]. Эти вещества классифицируют в зависимости от эффекта, оказывающего на постсинаптическую мембрану, на тормозные и возбуждающие. Возбуждающие или тормозной эффект нейромедиатора определяется видовым свойством рецептора, а не действием самого нейромедиатора. В возбуждающих синапсах, местах связи системы нейрон-нейрон или нейрон- исполнительный орган, нейромедиаторы диффундируют к постсинаптической мембране синапса и связываются с соответствующими рецептору и таким образом открывают Na^+ каналы, деполяризуя при этом мембрану, генерируя возбуждающий постсинаптический потенциал(ВПСП). Когда деполяризация достигает критического уровня возникает потенциал действия. Тормозные синапсы работают по схожему принципу, открывая калиевые и/или хлорные ионные каналы, что приводит к деполяризации мембраны и возникновению тормозного постсинаптического потенциала. Исследования показали, что некоторые медиаторы, например, ацетилхолин, способны оказывать тормозной или возбуждающий эффект в зависимости от условий их высвобождения. Таким образом ацетилхолин, связываясь с нХР генерируют ВПСП, открывая натриевые каналы, а при взаимодействии с МХР- ТПСП [Основы физиологии человека..., с.100].

Ацетилхолин- является одним из важнейших нейротрансмиттеров, преимущественно возбуждающего действия, и широко распространен в

представлен в различных отделах нервной системы и других органах, а также является единственным нейромедиатором соматической нервной системы, осуществляя передачу нервного импульса от нейрона к поперечно-полосатой мускулатуре через пирамидные пути, регулируя произвольные движения. В вегетативной нервной системе он регулирует работу внутренних органов и гладкой мускулатуры посредством нХР [Агаджанян Н.А, Смирнов В.М., с. 126, Ашмарин, с. 230]. В ВНС ацетилхолин служит нейромедиатором во всех преганглионарных нервных окончаниях симпатической и парасимпатической нервной системы (в том числе в мозговом слое надпочечников) через нХР, вызывая ВПСП. В то же время во всех постганглионарных парасимпатических нервах и постганглионарных симпатических нервах потовых желез АХ служит нейромедиатором через мХР. Ярко выражено участие ВНС в приспособительных реакциях, в случаях, когда организм подвергается действию стресса. Такая реакция характеризуется возбуждением нейронов в КБП головного мозга и всей ЦНС, что приводит к интенсивной мышечной деятельности и вызывает комплекс вегетативных и эндокринных реакций. Эмоциональные проявления стресса объясняются действием ВНС- выработкой адреналина, стимулом для которой является повышение концентрации АХ в преганглионарных терминалях симпатической нервной системы, концентрация которого повышается в крови вследствие его активного выхода из надпочечников [Агаджанян Н.А., Смирнов В.М., с. 167, Физиология человека, с.315, Ашмарин, с. 231, Дж. Николлс, Р. Мартин, Б. Валлас, с.342]. В ЦНС ацетилхолин сосредоточен преимущественно в базальных ганглиях, таламусе и сером веществе. Вставочные холинергические нейроны обнаружены в хвостатом ядре (ХТ), переднем роге латерального желудочка, которые являются одними из наиболее богатых ацетилхолиновых структур мозга. У млекопитающих большие скопления холинергических нейронов обнаружено в медиальном ядре перегородки, диагональной связке, базальном гигантоклеточном ядре, а также в ядрах моста. Холинергические нейроны в головном мозге участвуют в функциях памяти (кора больших полушарий,

гиппокамп и ряд других отделов), регуляции движений (базальные ганглии), уровне бодрствования (ретикулярная формация мозга). Высказано предположение, что АХ в подкорковых структурах мозга участвует в тонкой регуляции двигательных функций, в частности в механизмах инициации движения и двигательных стереотипах. Нарушение холинэргической иннервации характерно для ряда сенильных болезней мозга, а поражения в периферической нервной системе являются причиной аутоиммунного заболевания - миастении гравис [Ашмарин, с. 226-237].

По химической структуре ацетилхолин - эфир холина и уксусной кислоты, который синтезируется в цитоплазме нейронных окончаний (аксонах) под действием цитозольного фермента холинацетилтрансферазы из холина и ацетил-СоА. Скорость синтеза этого нейромедиатора определяется активностью энзима холинацетилтрансферазы, концентрацией холина в синаптических окончаниях, который не синтезируется в нейроне, а диффундирует из межклеточного холинового пула, и доступностью ацетил-СоА. Основными источниками холина служат:

1. Холин, образующийся при гидролизе АХ, диффундировавшего от рецептора, и находящийся в синаптической щели (система «обратного захвата»);
2. Холин, поступающий из плазмы крови через гематоэнцефалический барьер (средняя концентрация холина в плазме составляет 10 мкМ);
3. Холин, образующийся из гидролиза фосфатидилхолина в печени [Нерохимия: учебное пособие для вузов, с.127].

Механизм поглощения холина нервными клетками доподлинно неизвестен, но изучение концентрационной зависимости скорости его поглощения синаптосомами (выделенные в ходе экспериментов замкнутые мешочки из пресинаптической мембраны, содержащей митохондрии, цитозоль и синаптические пузырьки) выявило, что имеются два возможных транспортных механизма. Высокоаффинная Na-зависимая транспортная система обнаружена только в холинэргических нейронах, а низкоаффинные

переносчиками - во всех других тканях и неспецифичны для нервных клеток [Хухо, с.198].

Второй компонент ацетилхолина- ацетил-кофермент А- является конечным продуктом гликолиза, образующийся в митохондриях при окислительном декарбоксилировании пирувата посредством пируватдегидрогеназного комплекса. Поскольку ацетил-СоА не может проникать через митохондриальную мембрану, вопрос о поступлении его в цитоплазму остается нерешенным, но предполагается, что нервная ткань должна содержать отдельный пул ацетил-СоА [Дж. Николлс, Р. Мартин, Б. Валлас, с.268, Хухо, с.195].

Рядом исследований было показано, что холинергическая система используется не только как средство передачи импульсов между нейронами. Некоторые авторы полагают, что АХ участвует в регуляции синтеза белка в постсинаптических нейронах, в нейрон - глиальных взаимодействиях и энергообеспечении нейронов работающего вегетативного ганглия. Высказано предположение об участии холинергической передачи в регуляции транспорта веществ в вегетативном ганглии, воздействуя на структурную организацию межклеточного пространства, облегчая интерстициальный транспорт неполярных веществ [Тютюнщикова, с.375]. Так же было показано, что АХ осуществляет регуляцию цикла сон-бодрствование, а так регуляцию фазы быстрого сна. Количество АХ, интенсивность процессов синтеза и распада, а значит и активности холинацетилтрансферазы и ХЭ подвержены циркадным ритмам [Литвиненко, с.102, Омелянчик, с.172]. Эксперименты на крысах показали, что пик высвобожденного АХ приходится из первичных соматосенсорных корковых полей коррелирует с максимальным уровнем поведенческой активности [Day, Dansma, Fibiger, с.11].

1.2. ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЙ СИНАПС.

Как было отмечено выше, эффект оказываемый на постсинаптическую мембрану клетки воздействием ацетилхолина определяется свойствами постсинаптической мембраны, а именно рецепторами с которыми связывается

АХ. Это обстоятельство позволяет утверждать, что единого холинергического синапса не существует [4], поскольку такие синапсы различаются структурно, фармакологически и функционально. Синапс состоит из пре- и постсинаптических терминалей, разделенных щелью, заполненной олигосахаридной субстанцией, ширина которой может варьировать от 10 до 50 нм [Белова, с.5]. В синапсе так же присутствуют холинэстеразы - мембраносвязанные ферменты, гидролизующие ацетилхолин до уксусной кислоты и холина. На какой из мембран локализованы холинэстеразы доподлинно не установлено. Высказаны предположения, что в случае нервно-мышечного синапса ХЭ находится на базальной мембране, которая покрывает постсинаптическую терминаль и фактически разделяет пре- и постсинаптические мембраны. Традиционно предполагается, что ХЭ находятся на постсинаптической мембране, хотя и подвергается сомнениям [Хухо, с 187]. ХЭ реполяризует мембрану возвращая клетке возможность вновь проводить нервный импульс, и участвуют в синтезе АХ, т. к. с процессом синтеза сопряжен постоянный гидролиз АХ в синаптической щели в состоянии покоя. Продукты реакции частично диффундируют обратно в пресинаптическую терминаль и с помощью холинацетилтрансферазы вновь синтезируются в АХ. Уровень накопления АХ ограничен одновременным гидролизом внутриклеточными ХЭ, т.е. устанавливается динамическое равновесие между процессами синтеза и распада. Заключение АХ в везикулы смещает равновесие в сторону синтеза АХ, т.к. приводит к снижению концентрации медиатора в цитоплазме, при этом АХ в везикулах защищен от гидролиза холинэстеразами [Нерохимия: учебное пособие для вузов, с.140]. Через пресинаптическую мембрану осуществляется экзоцитоз везикул с АХ в синаптическую щель, в то время как постсинаптическая мембрана содержит рецепторы. Общим свойством химических синапсов является синаптическая задержка, определяемая временем освобождения нейромедиатора, которая составляет около 1 мс. Стимулом для высвобождения АХ является деполяризация нервного окончания с входом ионов кальция, за счет открытия потенциал

зависимых кальциевых каналов. Кальций играет важную роль в процессе высвобождения нейромедиатора: снижение концентрации кальция приводит к снижению скорости высвобождения АХ из везикул вплоть до полного блокирования в нервно-мышечном синапсе [Дж. Николлс, Р. Мартин, Б. Валлас, с.220]. Везикулы с АХ обратимо сливаются с пресинаптической мембраной, т.к. увеличение мембранной поверхности в связи со слиянием длится недолго. АХ высвобождается т.н. квантами (порциями). Один квант нейротрансмиттера соответствует одному содержимому везикулы. Одна везикула диаметром около 30 - 80 нм содержит около 7000 молекул АХ [Дж. Николлс, Р. Мартин, Б. Валлас, с.223] (по некоторым источникам около 10 тысяч и даже 40 тысяч молекул) [Страйер, с.312, Мецлер, с.147] и является постоянной величиной, количество высвобожденных квантов может значительно варьировать. Некоторое количество АХ высвобождается в неквантовой форме из цитозоля пресинаптической терминали, генерируя миниатюрные потенциалы действия, но не вызывает постсинаптического ответа в физиологических условиях. Такое незначительное количество АХ гидролизуется АХЭ, предотвращая активацию рецепторов. В случае квантового выделения, а значит одновременного высвобождения 7000 молекул АХ и 1 везикулы, нейротрансмиттер достигает рецепторов за счет субстратного ингибирования АХЭ [Нерохимия: учебное пособие для вузов, с.157, Дж. Николлс, Р. Мартин, Б. Валлас, с.287]. Итогом воздействия АХ на постсинаптическую мембрану является генерация ВПСП или ТПСП за счет открытия кальциевых каналов ионотропным или метаботропным способом.

1.3. АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ.

Ацетилхолиновые рецепторы являются асимметрично ориентированными в мембране интегральными белками, состоящими из нескольких субъединиц, обратимо связывающие агонисты. Рецепторы по своей сути являются лиганд-активируемыми каналами. Рецепторы АХ делят на две различные группы: никотиновые и мускариновые. Свои названия эти рецепторы получили благодаря активации посредством не только ацетилхолина, но и никотина в

случае нХР и мускарина – мХР. Было показано, что при постоянном воздействии этих веществ со временем рецепторы теряют чувствительность и для их активации требуется большая концентрация (явление десенситизации) [Нерохимия: учебное пособие для вузов, с.199, Хухо, с. 257, Дж. Николлс, Р. Мартин, Б. Валлас, с. 211-218]. Эти рецепторы различаются так же своими антагонистами: для нХР антагонистом является α -бунгаротоксин (яд змей), который селективно и необратимо связывается с нХР, для мХР – атропин - яд растительного происхождения. Различается так же локализация рецепторов. Никотиновые рецепторы организованы постсинаптически, дают быстрый ответ на агонист, но и эффект происходит быстрее, тогда как мускариновые расположены преимущественно на пресинаптической терминали, связывание агониста рецептором требует около минуты, а оказываемый эффект длится около 10 мин. Свойства мХР и нХР связаны с различными механизмами действия.

Ионотропные (быстродействующие) нХР оказывают прямое действие на ток ионов и не являются высокоселективными в отношении ионов, т.к. размер пор относительно велик в сравнении с электровозбудимыми каналами [Физиология человека, с.361]. нХР представляет собой крупный белок состоящий из 5 субъединиц – две α и по одной β , γ , δ - образующие кольцо вокруг центральной поры в последовательности $\alpha - \beta - \alpha - \gamma - \delta$ [Нерохимия: учебное пособие для вузов, с.230,]. Этот канал проницаем для ионов натрия и калия, однако ионы кальция так же способны проходить сквозь него. Модель, предложенная Нума и его коллегами при изучении первичной последовательности белка-рецептора, строится на обнаружении в этой структуре обширных гидрофобных участков из аминокислот. Согласно этой модели, рецептор имеет 4 трансмембранных домена М1-М4, при чем эти домены являются β -спиралями, за исключением участка М2. Оба терминальных участка молекулы, N- и С- концы, расположены во внеклеточном пространстве [Cholinergic mechanism function..., с.531-535]. Участки субъединиц, расположенные над поверхностью мембраны (внеклеточно) служат для

узнавания нейромедиатора. Конформационные состояния открытого и закрытого ионного канала различаются. В состоянии покоя, пока не произошла стимуляция рецептора ацетилхолином, канал находится в закрытом состоянии. Связывание АХ приводит к вращательному движению β -спиралей во внеклеточных участках нХР, формирующих устье канала, обращенное в синаптическую щель. Это вращение так же передается α -спирали, участку M2, обращенной в просвет поры, в направлении от центра. Точная локализация воротного механизма канала не установлена, но предполагается, что он находится вблизи изгиба α -спирали [Дж. Николлс, Р. Мартин, Б. Валлас, с. 340]. В результате ионы натрия проходят через устье, сформированное субъединицами, внутрь клетки вызывая локальную деполяризацию, что влечет выход ионов калия. Ток калия возвращает потенциал мембраны к исходной величине. Быстродействующая регуляторная система обеспечивает быстрое возникновение и затухание потенциала действия, и большую частоту проведения нервного импульса. Скорость развития потенциала действия складывается из высокой скорости обратимого связывания агониста и рецептора, эффективного гидролиза АХ холинэстеразами, а также быстрого перехода канала из закрытого состояния в открытое.

Никотиновые рецепторы подразделяются на два подтипа: мышечные и ганглионарные [Cholinergic mechanism function..., с.470, Acetylcholine nicotinic receptors..., с. 412]. Мышечные нХР представляют собой гетеропентамеры. Они локализованы преимущественно в нервно-мышечных синапсах, более чувствительны к бунгаротоксину и тубокурарину. Ганглионарные более чувствительны к никотину и бензогексонию, сосредоточены в вегетативных ганглиях и хромаффинной ткани надпочечников. Для ганглионарного типа так же характерно наличие 12 типов субъединиц $\alpha 2 - \alpha 10$ и $\beta 2, \beta 3, \beta 4$ [Cholinergic mechanism function..., с.477]. Они могут быть как гомопентамерами состоящими из субъединиц $\alpha 7 - \alpha 10$, так и гетеропентамерами, образованными различными комбинациями $\alpha 2 - \alpha 6$ и $\beta 2- \beta 4$ [Acetylcholine nicotinic receptors..., с. 428]. Максимальная плотность нХР ганглионарного типа обнаружена в ядрах

таламуса, гипоталамусе и КБП. Этот тип рецептора может быть локализован и на пресинаптической мембране, участвуя в модуляции активности синапсов, активируемых другими нейротрансмиттерами. Оба типа нХР обнаружены в головном мозге.

Постсинаптический потенциал длится всего несколько миллисекунд, в случае если не произошло дополнительного выхода ацетилхолина. В этом случае концентрация ацетилхолина в синаптической щели падает вследствие его гидролиза ферментом АХЭ и обратной диффузии в пресинаптическую терминаль. Снижение уровня АХ приводит к диссоциации комплекса рецептор-нейромедиатор и канал возвращается в закрытую конформацию.

Мускариновые холинорецепторы значительно отличаются от нХР по структуре, локализации и механизму действия. Метаботропные (медленные) мХР локализованные не оказывают прямого воздействия на проницаемость ионов, а передает сигнал посредством вторичных мессенджеров, т.е. посредством сопряженных G-белков. Система метаботропных рецепторов состоит как минимум из трех белков: рецептора, связывающего медиатор; G-белка - передатчика сигнала; белка-эффектора, т.е. фермента. Зачастую непрягая синаптическая передача метаботропным механизмом выполняет модулирующую функцию деятельности ионотропных механизмов. В отличие от нХР, постсинаптический ответ через мХР длится дольше. Эффекты развиваются спустя 1-2 минуты после взаимодействия с АХ и затухают за несколько десятков минут, что обусловлено сложностью запускаемого процесса и отличной от нХР кинетикой. Работа мХР связана с психоэмоциональным восприятием, распознаванием образов в центральной нервной системе.

МХР- крупный белок, имеющий 7 трансмембранных доменов с внеклеточным аминным N- концом и внутриклеточным карбонильным C-концом. Вторая и третья цитоплазматические петли образуют место связывания с G-белком. Активация мХР вызывает диссоциацию субъединиц G-белка, который связываются с внутриклеточными доменами. Известно 5 генетически отличных изоформ мХР, различие которых заключается в передаче сигнала

различным системам внутриклеточной сигнализации. Изоформы в свою очередь делятся на две подгруппы: М1, М3, М5 активируют класс G-белков, приводящий к расщеплению инозитолфосфата, а М2 и М4 активизируют G-белки, приводящие к ингибированию аденилатциклазы и активации калиевой проводимости. Все подтипы мХР могут активировать не рецепторные тирозинкиназы [Cholinergic mechanism function..., с 314.]. М1 рецепторы локализованы в ЦНС и вегетативных ганглиях, М2- основной подтип мХР в сердце, М3 обнаружены в гладких мышцах и большинстве экзокринных желез; М4 так же находятся в сердце и ЦНС, а также в стенках легочных альвеол, М5 холинорецепторы - в ЦНС, слюнных железах, радужной оболочке, в мононуклеарных клетках крови.

G-белок состоит из 2-3 субъединиц, в неактивном состоянии связан с молекулой гуаниндифосфата. При взаимодействии с рецептором белок меняет конформацию таким образом, что оказывается связанным с гуанинтрифосфатом, и в такой форме активирует ферменты, образующие вторичный мессенджер. Вторичные мессенджеры активируют внутриклеточные протеинкиназы, фосфорилирующие мембранные белки, таким образом воздействуя на ток ионов. В случае, когда происходит гиперполяризация мембраны, например в сердечной мышце, возникает ТПСР [Белова, 20].

Различие в скорости постсинаптического ответа в нХР и мХР заключается в разнице кинетики связывания лиганда с рецептором, многоэтапным каскадом реакций проведения сигнала мХР, а также медленным образованием вторичных мессенджеров и фосфорилированием белков-мишеней.

НХР и мХР являются аллостерическими белками, регулирующие ионную проницаемость мембраны. Аллостерические эффекты наблюдаются в том случае, когда связывание одного лиганда влияет на связывание другого и наоборот. Образуется тройной комплекс между двумя лигандами и рецептором.

С помощью метода слепой стыковки были показаны 3 возможных сайта связывания аллостерических модуляторов, таких как галантамин, кодеин и

эзерин для нХР через ацетилхолинсвязывающий белок и моделями рецепторов $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$ и $\alpha 4\beta 2$ человека. По полученным данным предполагается, что один из аллостерических сайтов связывания локализован напротив места связывания агонистов и участвует в процессе потенцирования нХР [Iorga, с. 370].

В случае метаботропных рецепторов существует положительное кооперативное взаимодействие между связыванием агониста с G-белком и рецептором, что способствует формированию комплекса рецептор- агонист- G-белок. Такой комплекс имеет большее сродство к агонистам, чем только рецептор. Для мускариновых холинорецепторов так же был описан аллостерический сайт связывания, который присутствует во всех подтипах мХР. Было показано, что аллостерический сайт связывания галантамина, который резко тормозит ассоциацию и диссоциацию антагонистов мХР, расположен на внеклеточной поверхности рецептора [Klein, Loffelholz, с. 163].

1.4. ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ: КЛАССИФИКАЦИЯ, ФУНКЦИИ, СВОЙСТВА.

Чтобы восстановить способность к передаче сигнала после индукции изменений электрического потенциала на постсинаптической терминали нейрона, избыток АХ, высвобожденного из пресинаптической терминали, должен быть быстро разрушен и удален из синаптической щели, чтобы действие АХ было кратковременным. В этом заключается классическая функция ХЭ- ограничение действия АХ на постсинаптическую мембрану. После высвобождения АХ взаимодействует сразу с двумя белками: рецептором и АХЭ. Таким образом, АХЭ участвует в синтезе АХ: продукты гидролиза диффундируют обратно в пресинаптическую терминаль.

Холинэстеразы относят к классу гидролаз, они осуществляют гидролиз ковалентной сложноэфирную связи между холином и ацетатом АХ. Традиционно в семействе ХЭ выделяют истинную (АХЭ) и ложную (БуХЭ) холинэстеразы в зависимости от субстрата и специфичности ингибиторов [Яковлев, с.128, Harel, Sussman, Krejci, с. 10829]. К первому классу ферментов относятся ХЭ нервной ткани и эритроцитов, ко второму- ХЭ сыворотки крови

печени, поджелудочной железы, некоторые авторы указывают на наличие БуХЭ в некоторых нейронах [Reid, Chilukuri, Darvesh, с.60]. Так же были выявлены различия в оптимуме рН: для АХЭ 7,5-8,0, для БуХЭ 8,5. При изучении активности этих ферментов для разделения их друг от друга используют специфические субстраты или ингибиторы, действующих на определенный фермент. В случае, если используются специфические ингибиторы, в качестве субстрата может использоваться ацетилхолин [Яковлев, с.131].

Оба этих фермента достаточно хорошо изучены в молекулярном плане: выполнен рентгеноструктурный анализ кристаллов обоих ферментов, что дает представление о первичной последовательности, обнаружено разнообразие молекулярных форм АХЭ, были описаны активные центры ферментов, а также «якорные» некаталитические участки [Crystal structure of..., с. 414143, Silman, Sussman, с. 8, Tougu, с.159, Structural roles of..., с.676, Bosak, Katalinic, Kovarik, с. 184, Old and new questions, с. 33]

Ацетилхолинэстераза (АChE, EC 3.1.1.7) отличается высокой скоростью гидролиза ацетилхолина: за 1 минуту 295 молекул гидролизуемого АХ приходится на один активный центр [Клайн, с.441]. Высокая скорость гидролиза объясняется высокой степенью аффинности АХ и АХЭ и образованием прочносвязанного комплекса фермент- субстрат. Ацетилхолин не единственный возможный субстрат. АХЭ успешно гидролизует разнообразные эфиры карбоновых кислот, включая многие сложные эфиры жирных кислот (этилацетат, триацетин и др.) и ароматические сложные эфиры (например, фенилацетат), способен гидролизовать эфиры вторичных спиртов, при этом некоторые из этих субстратов гидролизуются примерно с такой же скоростью, как и АХ. Стоит отметить, что ацетилтиохолин гидролизуются быстрее, чем АХ. Чем длиннее ацильные группы у молекулы субстрата, тем медленнее протекает гидролиз этих соединений АХЭ. Так, эфиры муравьиной, пропионовой и масляной кислот расщепляются весьма медленно, более сложные эфиры не расщепляются. Ацетаты вне зависимости от спирта или фенола расщепляются

быстрее соответствующих эфиров. Так же скорость гидролиза субстратов АХЭ определяется их близостью ацетилхолиновой конфигурации. Электростатические взаимодействия между ферментом и положительными зарядами лиганда играют важную роль в распознавании субстрата, однако было показано, что фермент способен к быстрому гидролизу нейтральных субстратов. Отсюда следует, что субстрат не должен обладать положительным зарядом, главное, чтобы его форма была близка к пространственной конфигурации ацетилхолина [Клайн, с.443, Tougu, с. 163]. Истинная холинэстераза не гидролизует бутирилхолин и бензилхолин [Яковлев, 173]. Для идентификации АХЭ в качестве субстрата принято использовать ацетил- β -метилхолин, так как он гидролизуется АХЭ с высокой скоростью и не гидролизуется вторым подклассом холинэстераз.

Бутирилхолинэстераза (ВСhE, EC 3.1.1.8)- структурный аналог АХЭ, в отличие от нее не катализирует гидролиз ацетил- β -метилхолин, но катализировала гидролиз бутирилхолина, ацетилхолина, бензилхолина и пропионилхолина. Следует отметить, что гидролиз АХ этим ферментом происходит медленнее, чем в гидролизе под действием АХЭ. Так же БуХЭ не тормозится избытком АХ, тогда как для АХЭ существует определенный оптимум концентрации субстрата. Оптимальной ацильной группой вне зависимости от алкильной группы является остаток масляной кислоты, нежели ацетат. Так же отличительным свойством является медленность воздействия на сложные эфиры вторичных спиртов: ацетил- и бутирил- β -метилхолин разлагаются очень медленно, за исключением ацетил- β - метилтиохолин. В остальном субстратная специфичность этих двух ферментов одинакова, в частности в особенности субстратов близких к конфигурации холина. Тем не менее, было показано, что БуХЭ способен к гидролизу отрицательно заряженный сложный эфир аспирина, со скоростью близкой к скорости гидролиза его естественного субстрата [Яковлев, с. 194, Tougu, с. 157, Клайн, с.457]. Бутирилхолин не является физиологическим субстратом в мозге человека, но используется в качестве субстрата для дифференцировки двух

типов холинэстераз. Важным отличием БуХЭ от АХЭ является его кинетика по отношению ацетилхолина. Избыток ацетилхолина ингибирует АХЭ, но не ингибирует БуХЭ, поэтому он действует при избытке субстрата.

Так же на разделение этих двух ферментов повлияло их тканеспецифичное расположение: известно, что АХЭ присутствует в мембране мозга, мышц, эритроцитов, тогда как БуХЭ обладает высокой активностью в печени, кишечнике, сердце, почках и легких. Формы и распределение холинэстераз *in vivo* разнообразны. Присутствие АХЭ вне холинергических синапсов и существование сестринского фермента БуХЭ, функция которого до конца не ясна, позволяют предположить, что холинэстеразы могут участвовать в функциях несвязанных с гидролизом ацетилхолина [Stepankova S., Komersb.161]

Некоторыми авторами так же выделяются пропионилхолинэстеразы различных источников, которые гидролизуют пропионилхолин быстрее других субстратов. Так же считается, что холинэстеразы жвачных животных и беспозвоночных не относятся ни к одному из известных подклассов ХЭ.

ХЭ состоят из 4 идентичных полипептидных цепей, каждая из которых содержит активный центр и несколько регуляторных связывающих участков в активном центре ХЭ выделяют три функционально значимых участка: «оксианионный центр» служит для связывания кислорода карбонильной группы субстрата, «каталитическая триада» (эстеразный участок) и «анионный центр», связывающий четвертичную аммониевую группу субстрата [Петров, Харламова, Никольский, с.162]. Каталитическая триада представляет собой остатки гистидина, глутаминовой кислоты и серина. Гидроксильная группа серина ответственна за гидролиз, т.к. она приводит к ацелированию фермента. Анионный центр служит для ориентации молекула субстрата, а также, возможно, участвует в механизмах ингибирования АХЭ избытком субстрата. Активный центр располагается на дне молекулы. Как только АХ достигает активного центра, с помощью оксианионного и анионного участков, молекула растягивается между ними таким образом, что эфирная связь

находится напротив эстеразного центра и происходит гидролиз. Около 65% аминокислотных последовательностей АХЭ и БуХЭ гомологичны, в области каталитического центра и анионной области отсутствуют по три ароматических остатка. Эти различия объясняют различную скорость гидролиза АХ этими ферментами, а также тот факт, что БуХЭ менее подвержена субстратному ингибированию [Does "butyrylization" of..., с. 7439, Chatonnet, Lockridge, с.627].

Аминокислотная последовательность АХЭ и БуХЭ гомологичны на 53% и их структура так же сходна. Основным различием в трехмерной структуре является положение ацильной петли, которая отличается конформационной подвижностью, а различия в боковых цепях создают дополнительный объем БуХЭ по сравнению с АХЭ [Холинэстеразы человека. Суперкомпьютерные..., с. 32-33].

В то время как физиологическая роль АХЭ сводится к гидролизу АХ в нервном синапсе, точная функция БуХЭ не выявлена. Считается, что она дублирует роль АХЭ в условиях дисфункции последней, а также способна регулировать АХЭ. Были проведены исследования, в которых удалось вывести мутантную линию мышей, лишенную АХЭ или БуХЭ, показавшие, что мыши без АХЭ имеют ярко выраженные мышечные и поведенческие аномалии, тогда как животные без БуХЭ практически ничем не отличались от здоровых животных. Двойные мутанты без обоих ферментов не жизнеспособны [Reduced acetylcholine receptor..., с. 319]. Так же было выявлено, что БуХЭ участвует в метаболизме липидов и липопротеинов, дифференцировке и развитии нервной ткани, так же может быть использован в качестве дезактиватора некоторых соединений, таких как сукцинилдихолин, кокаин и др. [Darvesh, Hopkins, Geula, с. 131-134]

Так же для холинэстераз выделяют некаталитические функции вне ЦНС, так как эти ферменты были обнаружены в потовых железах, лимфатической системе и эмбриональных тканях и принимают участие во множестве физиологических процессах и связаны с проявлениями тяжелых нейромышечных и нервных заболеваний. Исследованиями было показано, что

ацетилхолинэстераза участвует в процессе роста аксонов и формировании синапсов [Soreq H., Seidman S, P.193, Sternfeld M., Ming G.-L. с. 1242.], а так в росте злокачественных опухолей.

1.5. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ ХОЛИНЭСТЕРАЗ.

Позвоночные имеют различный формы АХЭ, которые обладают одинаковой каталитической активностью, но различаются по своей четвертичной структуре и по взаимодействию с мембранами или внеклеточным матриксом. Каталитические субъединицы генерируются из одного гена и подвергаются различным посттрансляционным модификациям и в некоторых случаях ассоциируются со структурными субъединицами. Для АХЭ представлен ряд молекулярных форм, полученных альтернативным сплайсингом и присоединением некаталитической якорной субъединицы [Structural roles of ..., 676, Bosak, Katalinic, Kovarik, с. 180, Park, Kim, Yoo, с. 2653, Meshorer, Soreq, с.220, Lionetto, Caricato, Calisi, с.8]. Вариантов для альтернативного сплайсинга БУХЭ обнаружено не было, но было обнаружено около 40 вариантов мутантных версий БУХЭ. БХЭ плазмы крови человека помимо обычной формы (U) имеет около 9 фенотипических изоформ, существование которых является результатом различных полиморфных модификаций гена, кодирующего БХЭ. К ним относятся «атипичные» (A), «молчащие» (S), фторидре-зистентные (F), а также К (Kalow) и J (James) — гомо- и гетерозиготные варианты БХЭ [Холинэстеразы человека. Сцперкомпьютерные..., с. 36] Альтернативный сплайсинг на 3'-конце предполагает три возможных транскрипта. Эритроцитарный вариант (АХЭ-Е) кодирует 32 аминокислоты, отвечающее за формирование гидрофобного якоря на поверхности эритроцитов [Massoulié, с.137]. Синаптический вариант АХЭ-S кодирует 40 аминокислот, которые формируют специфический домен, с которым связываются 2 различные якорные субъединицы. Существует так же «read through» вариант АХЭ-R найденный в гемопоэтических клетках крыс и мышей, который в норме не образуется в электровозбудимых клетках. Он экспрессируется при ингибировании АХЭ и болезни Альцгеймера [Acute stress

facilitates..., с. 133, The readthrough variant..., с.630]. Так же есть предположения, что под действием стрессовых факторов происходит смещение равновесия между экспрессией АХЭ-S/-R форм в сторону R в головном мозге, для которого характерно преобладание S-формы, что было показано на мышцах, стрессовым фактором для которых было прохождение лабиринта или плавание [Acetylcholinesterase inhibitor pretreatment..., с. 92, Strain and regional..., с.107-112]. Для 5'-конца описаны 4 альтернативных варианта первого экзона, которые экспрессируются независимо от варианта сплайсинга на 3'-конце. Роль таких изоформ не установлена [Петров, Харламова, Никольский, с.165].

Существуют два различных варианта якорных домена: Col Q - хвост, состоящий из трех переплетенных коллагеновых нитей, и PRiMA-гидрофобный белок. Степень олигомеризации определяется молекулярной формой, т.е. длиной С-концевого участка. Димеры или тетрамеры каталитических субъединиц связываются с якорной частью. Самой распространенной молекулярной формой является АХЭ-S, который присутствует в виде тетрамеров в мембранах нервных и мышечных клеток. АХЭ-E присутствует в виде димеров в мембранах эритроцитов и панкреатической мембране [Bosak, с. 183, Петров, Харламова, Никольский, с.167]. В отличие от представленных молекулярных форм, АХЭ-R не имеет элементов обуславливающих олигомеризацию элементов и присутствует в виде растворимого мономера, локализованного в синаптических трещинах или крови.

Физиологическая роль всех возможных молекулярных форм доподлинно неясна. С учетом того, что кинетика гидролиза субстрата у различных молекулярных форм одинакова, предполагается, что отличие может быть в выполняемых ими некаталитических функций [Vigny, Gisiger, Massouli, с. 2588].

Рядом исследований было показано, что ХЭ не ограничиваются своей основной биологической функцией, заключающийся в нервно-химической передаче. Была выявлена активность АХЭ в участках головного мозга, где

другие маркеры холинергической передачи, например, холинацетилтрансфераза, не обнаружены. Такое множество предполагаемых некаталитических функций объясняется возможностью существования различных молекулярных форм АХЭ из различных источников, таких как гемопоэтических клетках, эндотелии сосудов, лейкоцитах, остеобластах. Было показано возможное участие АХЭ в образовании опухолей. Из возможных функций так же отмечают влияние на фактор роста нейронов. В последних исследованиях выявлена причастность АХЭ к формированию болезни Альцгеймера, так как она способна взаимодействовать с β -амилоидом и повышать его токсичность, обуславливая нейродегенеративные изменения головного мозга. Так же к некаталитической функции АХЭ приписывают, способность АХЭ участвовать в клеточной адгезии.

1.6. ИНГИБИРОВАНИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗ. ХАРАКТЕРИСТИКА ИНГИБИТОРОВ.

Давно общепризнанно физиологическое, токсикологическое и фармакологическое значение холинэстераз, к которым относятся ацетилхолинэстеразы (АХЭ; ЕС. 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразы (ЕС. 3.1.1.8; БХЭ) [Molecular and cellular..., с. 47, Taylor, Radic, с.297, Masson, O. Lockridge, с.111]. Оба фермента, АХЭ и БХЭ, проявляют гистерезисное поведение при гидролизе N-метилиндоксилацетата (NMIA) [Hysteresis of insectacetylcholinesterase, с.410]. Гистерезис в ферментативном катализе может быть определен как замедление скорости реакции при изменении концентрации субстрата или ингибитора. Во время приближения к стационарному состоянию, гистерезис с NMIA характеризуется лаг-фазой (задержкой) длиной в несколько минут. При реакции с субстратом – производным ацетанилида, 3-(ацетамидо) N,N,N-триметиланилин (АТМА), предстационарная фаза выглядит в виде всплеска, превышающего несколько минут [Kinetic analysis of..., с.1143]. Эти примеры поведения системы в предстационарной фазе были проинтерпретированы как результаты медленного равновесия между двумя формами фермента, E и E', имеющими разную каталитическую активность в отношении этих субстратов.

Кинетическая кооперативность с длинной лаг-фазой или фазой всплеска при приближении к стационарному состоянию отражает зависящие от времени конформационные изменения, что является характеристикой гистерезисных ферментов [Frieden, с.487, Neet, Ainslie, с. 212, Kinetic manifestations of..., с. 35]

Для гистерезисных ферментов наблюдаются большие времена индукции, и вследствие этого их не следует путать с периодами индукции схемы Михаэлиса–Ментен, имеющими длину порядка микросекунд или менее, которые необходимы для образования фермент-субстратного комплекса ES.

Нативная БУХЭ человека и некоторые ее мутанты проявляют гистерезисное поведение при гидролизе бутирилтиохолина и бензоилхолина. Гистерезис БХЭ человека и крысы с VzCh в качестве субстрата был еще более сложным, и демонстрировал затухающие колебания, которые накладывались на предстационарную лаг-фазу [Damped oscillatory hysteretic..., с.226, Rat butyrylcholinesterase-catalysed..., с.1191]. Сложное поведение холинэстераз, зависящее от времени, также наблюдалось для реакции холинэстераз с объемными необратимыми ингибиторами, такими как карбамоилирующий агент N-метил-N-(2-нитрофенил) карбамоилхлорид (MNPCC) и циклический органо-фосфат крезилсалигенинфосфат (CBDP).

Гистерезисное поведение холинэстераз зависит от самого фермента, химической структуры субстрата или ингибитора и физико-химического состояния среды. Блокируя холинэстеразу в холинергических синапсах, антихолинэстеразные вещества предохраняют ацетилхолин от разрушения и таким образом усиливают и удлиняют его действие. Следовательно, при введении в организм антихолинэстеразных веществ их эффекты обусловлены в основном действием ацетилхолина. Отмечается брадикардия, снижение артериального давления, повышение тонуса гладких мышц желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря, бронхов, усиление секреции желез, сужение зрачков и снижение внутриглазного давления (особенно при использовании антихолинэстеразных средств в виде глазных капель). Заметно улучшается под влиянием антихолинэстеразных веществ проводимость в

нервно-мышечных синапсах, вследствие чего повышается тонус скелетных мышц.

Первым антихолинэстеразным веществом был физостигмин — алкалоид калабарских бобов, произрастающих в Западной Африке. Для парентерального введения физостигмин редко используется в связи с его высокой токсичностью. Растворы физостигмина в виде глазных капель применяют в основном для лечения глаукомы [Голиков]. Некоторые исследователи относят физостигмин к классу псевдонеобратимых ингибиторов или ингибиторам промежуточного действия, как и другие карбаматы. Ингибиторы такого действия ковалентно связываются с ферментом, при этом такая связь медленно разрушается, после чего фермент снова становится доступным. Карбаматы взаимодействуют с холинэстеразами в принципе так же, как и сам ацетилхолин, при чем образуют карбомоилированный комплекс с сериновым остатком каталитической триады ацетилхолинэстеразы, который гидролизуется с меньшей скоростью, чем ацилированная форма, возникающая в результате взаимодействия с АХЭ. К этому классу помимо физостигмина относятся килостигмин, фенсерин и толсерин. [Stepánková 160-171, Яковлев, 196]

Схема реакции карбаматов с холинэстеразами, предложенная Уилсоном, Гаррисоном и Гинсбургом объясняет взаимодействие карбаматов с холинэстеразами. Фермент, содержащий подвижный атом азота водорода в активном центре, реагирует с карбаматом с образованием комплекса, далее происходит выделение первого продукта реакции, т.е. спирта, и образование карбамилированного фермента, который при действии воды гидролизуется, с регенерацией фермента и образованием второго продукта реакции — N-алкилкарбаминовой кислоты. В присутствии карбаматов фермент находится в трех формах: двух неактивных и активной, причем первая неактивная форма представляет собой диссоциирующий комплекс, концентрация которого определяется константой ингибитора и константой, лимитирующей скорость образования свободного фермента путем гидролиза карбамилированной холинэстеразы. [Яковлев, 196].

Так же считается, что физостигмин является аллостерическим модулятором никотинового холинового рецептора, наряду со своим ингибирующим свойством. Точное положение сайта связывания аллостерического потенцирующего лиганда с нХР до конца неясно [Iorga,367].

Синтетический заменитель физостигмина — прозерин (неостигмин) оказался менее токсичным и нашел широкое применение в клинике: при атонии (снижение тонуса) кишечника, мочевого пузыря, матки во время родов, миастении (заболевание, сопровождающееся вялостью скелетных мышц), в глазной практике для лечения глаукомы [Майский, с. 386, Голиков, Розенгарт, 194].

Особый интерес представляет антихолинэстеразное средство - алкалоид галантамин (нивалин), выделенный из клубней подснежника. Показания для применения галантамина в основном такие же, как и для прозерина. Однако галантамин в отличие от прозерина хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер и облегчает проведение импульсов в синапсах центральной нервной системы. Благодаря этому свойству галантамин используется также при заболеваниях центральной нервной системы, в частности для лечения церебральных параличей [Голиков, Розенгарт, 215].

В качестве антихолинэстеразных средств для резорбтивного действия предложены препараты более длительного действия, чем прозерин, - это дистигмина бромид (убретид), пиридостигмина бромид (калимин, местинон) и оксазил (амбенония хлорид), а также кратковременного действия - хинотилин, который используется в качестве антагонистов антидеполяризующих миорелаксантов типа кураре для декураризации.

Перечисленные выше антихолинэстеразные вещества обладают обратимым действием, т.е. через несколько часов после их введения в организм активность ацетилхолинэстеразы полностью восстанавливается. В связи с этим они получили название антихолинэстеразных веществ обратимого действия.

Вторую группу антихолинэстеразных средств составляют вещества необратимого действия. К ним относятся в основном фосфорорганические

соединения (ФОС). Эти соединения очень активны и обладают высокой токсичностью. Некоторые из них (например, табун, зарин, заман и др.) взяты на вооружение в качестве химически отравляющих средств. Некоторые вещества из этой группы (хлорофос, пиррофос и др.) используются в качестве инсектицидов для уничтожения вредных насекомых — клопов, блох, тараканов и др. В медицинской практике для лечения глаукомы используется армин в виде глазных капель.

Поскольку фосфорорганические соединения обладают высокой токсичностью и используются в быту в качестве инсектицидов, то иногда бывают случаи отравления ими. Отравление антихолинэстеразными веществами (обратимого и необратимого действия) имеет сходную картину: возникает затруднение дыхания из-за спазма бронхов и скопления слизи в дыхательных путях, резко замедляется сердечная деятельность и падает артериальное давление. Усиливается выделение слюны, появляются потливость, рвота, понос, судороги. Характерными признаками отравления являются сужение зрачков и нарушение аккомодации.

Первая помощь при таких отравлениях заключается в экстренном введении атропина, искусственном дыхании (при остановке дыхания), промывании желудка и проведении симптоматической терапии (сердечно-сосудистые средства, противосудорожные и др.). При отравлении фосфорорганическими соединениями, кроме того, назначают реактиваторы холинэстеразы (например, дипироксим, изонитрозин), которые восстанавливают активность ацетилхолинэстеразы. Сильным реактиватором холинэстеразы является диэтиксим, который менее токсичен в сравнении с дипироксимом и легко проникает через гематоэнцефалический барьер [Голиков, Розенгарт, 234].

Механизм реактивации холинэстеразы веществами, содержащими оксильную группу ($\sim\text{CH}=\text{N}-\text{OH}$), состоит в более прочной связи этой группы с атомом фосфора антихолинэстеразного вещества, в результате чего

восстанавливается способность холинэстеразы гидролизовать ацетилхолин [Reaction of cressyl..., с. 802].

1.7. СТРЕСС.

Слово «стресс» часто употребляется в обиходе и повседневной жизни, что соответствует реальной жизненной ситуации, поскольку жизнь людей без стрессов не возможна. Это слово в биологии и медицине заимствовано из определения стресса в физике как деформирующей силы. Физиолог Клод Бернар более 150 лет назад утверждал, что для сохранения жизни необходимо поддерживать относительное постоянство внутренней среды организма или гомеостаз. Согласно взглядам другого физиолога, У. Каннона (1935), критический стресс или разрушающее напряжение может приводить к недостаточности механизмов, обеспечивающих физиологические параметры или гомеостаз, т.е. постоянство внутренней среды.

Канадский исследователь Ганс Селье еще в 1925 г. обратил внимание на ряд общих симптомов при различных заболеваниях, которые включали слабость, недомогание, потерю аппетита и веса, боли в мышцах и суставах, желудочно-кишечные расстройства. В дальнейшем он вводил животным различные токсические вещества и наблюдал развитие общего синдрома, сопровождающегося стимуляцией коркового слоя надпочечников с его гипертрофией и исчезновением секреторных гранул, атрофией тимико-лимфатического аппарата с лимфопенией и нейтропенией и образованием язв в желудочно-кишечном тракте. Анализируя полученные данные, Ганс Селье применил слово «стресс» для характеристики состояния неспецифического напряжения в живом организме с вовлечением всех систем и органов, но в особенности эндокринной. Г.Селье определил стресс как «совокупность всех неспецифических изменений, возникающих под влиянием любых сильных воздействий и сопровождающихся перестройкой защитных систем организма», т.е. Г.Селье открыл общий или генерализованный, адаптационный (приспособительный) синдром – стереотипную реакцию организма, которая не

зависела от специфики повреждающего агента или характера стрессирующего фактора [Селье, с.54].

В общем виде схему воздействия информационного стресс-фактора можно представить следующим образом. Ответное раздражение на воздействующий фактор со стороны коры головного мозга поступает в структуры гипоталамуса, где происходит генерация соответствующих фактору эмоциональных реакций и стимуляция симпатического и парасимпатического отделов нервной системы. Активация последних вызывает раздражение мозгового вещества коры надпочечников, что приводит к выбросу в кровяное русло адреналина и норадреналина. Гиперадреналинемия, в свою очередь, вызывает повышение содержания других гормонов и биологически активных, энергоемких веществ, в частности, сахара и холестерина. Повышенная секреторная активность стимулирует работу практически всех органов и систем, в первую очередь, сердечно-сосудистую, дыхательную, мышечную, повышает интенсивность течения обменных процессов.

Теория нейрогуморальной регуляции стрессорного воздействия в настоящее время разработана достаточно фундаментально, что позволяет определить основные механизмы адаптивной реакции организма.

В развитии реакции организма на сильные и сверхсильные раздражения наибольшее значение имеют две системы - симпатoadреналовая и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая [Селье, с.68]. Особо важную роль в развитии стресс-реакций играет гипоталамус, который через гипофиз направляет, стимулирует и угнетает ряд гуморально-гормональных реакций, характерных для состояния стресса. Нейрогормоны передней доли гипоталамуса (вазопрессин и окситоцин) поступают по гипофизарно-портальному пути в заднюю долю гипофиза, а нейрогормоны задней доли гипоталамуса (статины) подавляют деятельность его передней доли. Как отмечает Г. Н. Кассиль, любой стресс - физический, эмоциональный, вызванный болезнью, потрясением, болью, травмой сопровождается цепной реакцией, начиная с коры головного мозга, кончая субклеточными, молекулярными образованиями. «Дыхание

стресса проносится по всему организму, и внутренняя среда перестраивает (адаптирует) свой состав, физико-химические и биологические свойства, обеспечивая организму условия наибольшего благоприятствования в борьбе с опасностью» [Селье, с.82].

Исследования, выполненные под руководством Г. Н. Кассиля, позволили ему предложить следующую схему развития стресс-реакции, отражающую нервные и гуморально-гормональные механизмы регуляции стресса.

Возбуждение коры головного мозга при стрессовых воздействиях передается на гипоталамус, где происходит освобождение - переход из связанной в активную форму норадреналина нервных клеток. Активируя норадренергические элементы различных отделов центральной нервной системы, в первую очередь, ее лимбико-ретикулярной формации, норадреналин через высшие симпатические центры стимулирует деятельность симпатoadреналовой системы; это ведет к повышению образования и поступлению во внутреннюю среду гормона мозгового слоя надпочечников – адреналина. Адреналин через гематоэнцефалический барьер проникает из крови в заднюю долю гипоталамуса, а возможно и в другие отделы мозга. Возникающее под влиянием адренергических элементов общее возбуждение мозга в силу противоположной реакции центральных и периферических образований нервной системы на действие одного и того же химического раздражителя способствует повышению активности тропных механизмов – серотонинергических и холинергических. Они стимулируют образование нейросекреторными клетками кортиколиберинов, которые, попадая в гипофиз, вызывают усиленное поступление в кровь адренотропного гормона. Под его влиянием в коре надпочечников увеличивается синтез кортикостероидов, содержание которых в крови нарастает. Кортикостероиды, легко проникая через гематоэнцефалический барьер в мозг, по закону обратной связи тормозят образование кортиколиберинов, что ведет к снижению их уровня во внутренней среде. При длительных и угрожающих жизни стрессовых ситуациях кортикостероиды связываются с особым белком крови -

транскортином и перестают проникать в мозг (соединение кортикостероидов с транскортином задерживается гематоэнцефалическим барьером). В мозг перестает поступать достоверная информация об уровне кортикостероидов в крови, что приводит к нарушению обратной связи и расстройству законов регуляции функций. Непрерывающееся образование и поступление кортикостероидов в кровь приводит к истощению коры головного мозга и мозгового слоя надпочечников [Селье, с.93].

В представлении Г. Н. Кассиля о механизмах стресса важную роль играют трофотропные системы. «Их усиление... как в стадии резистентности, так и в процессе восстановления после стрессовой реакции... является, возможно, компенсаторной реакцией, «мерой физиологической защиты», направленной на сохранение гомеостаза... Компенсация, протекающая поначалу в границах гомеостаза при продолжающемся стрессе, становится постепенно избыточной, опасной для организма. Возникает стадия гипер- и субкомпенсации, в которой гомеостатические механизмы подавлены, эрготропные системы истощены, трофотропные доминируют. Развивается дисбаланс в соотношении катаболических и анаболических метаболитов и, если не приняты соответствующие меры, организм приходит в состояние коллапса, шока с нарушением основных жизненных функций. Расстраиваются взаимоотношения между отдельными компонентами единого нейрогуморально-гормонального барьерного комплекса, стремительно изменяются состав и свойства внутренней среды, перестают действовать гомеостатические механизмы» [Селье, с.114].

По мнению Г. Н. Кассиля, представленная схема регуляции стресса далеко неполная. Взаимоотношения нейрогуморально-гормональных процессов дополняются воздействием биологически активных веществ эрго- и трофотропного ряда, ферментных систем, влиянием гематоэнцефалического барьера и, возможно, других гистогематических барьеров.

Точка зрения относительно однозначной связи отрицательных эмоций с возбуждением симпатикоадреналовой системы, а положительных – с

возбуждением вагоинсулярной (то есть, соответственно, с симпатическим и парасимпатическим эффектом), в настоящее время считается упрощенной и неточной. Установлено, что нейрохимические и нейрофизиологические изменения при сильных отрицательных эмоциях могут проявляться как в виде комплекса симпатических и парасимпатических реакций, а при сильных положительных эмоциях – в виде симпатических эффектов [Судаков, с.152].

Нейрофизиологическими элементами нейрогуморальной системы адаптации организма при стрессе являются функциональные афферентно-эфферентные связи гипоталамуса, таламуса, миндалевидного комплекса, гиппокампа и различные зоны коры больших полушарий мозга [Судаков, с.173].

Установлено, что роль одних образований мозга (переднего гипоталамуса, ретикулярной формации, среднего мозга) в развитии стресса одинакова при воздействии различных экстремальных факторов, тогда как роль других (моторной коры больших полушарий, мозжечка) зависит от природы и характера воздействия.

Следует также отметить, что развивающиеся при стрессе гормональные процессы оказывают влияние не только на соматические органы и клетки, а осуществляют гуморальные влияния на сами эндокринные органы по механизму обратных связей, которые Г. Г. Аркелов представил в следующих вариантах:

1. Короткая петля обратной связи: гипофиз – АКТГ – гипофиз.
2. Длинная петля обратной связи: гипофиз – АКТГ – надпочечники – кортикостероиды – гипофиз и гипоталамус – подавление продуктов релизинг-факторов.
3. Гипоталамус – гипофиз – АКТГ – надпочечники – стероиды – комплекс мозговых структур (ретикулярная формация, мотивационные и лимбические структуры) – длительное изменение электрической и химической активности мозга [Аркелов, с.50].

Автор отмечает, что генерализованная активация мозга при и после действия стрессоров происходит как нейрогенным, так и гуморальным путем при действии стероидов на центральные нейроны. Интервенция стероидных гормонов в мозге при сохранении их концентрации возможна из-за повреждения гематоэнцефалического барьера по мере развития стресса и дистрессовых явлений [Аркелов, с.52].

Следует также отметить, что представление о процессах регуляции и координации в организме при развитии стресса дает анализ эрготропных и трофотропных систем и состояний. Состояния эти смешанные – в них участвуют вегетативные, двигательные, чувствительные и психические функции. К эрготропным относят обычно адренергические механизмы, к трофотропным – холинергические.

Эрготропные состояния характеризуются активацией деятельности соматических и психических систем. Медиаторами эрготропного ряда являются катехоламины – это дофамин, его производные – норадреналин, производное последнего – адреналин. Эрготропные функции резко усиливаются при стрессовых состояниях, интенсивной физической и умственной деятельности. Они способствуют приспособлению организма к меняющимся условиям внешней среды, повышают расход энергетических запасов, усиливают катаболические, диссимиляторные процессы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования активности ацетил- и бутирилхолинэстеразы проводились на базе кафедры «Анатомии и физиологии человека и животных» Института биологии Тюменского Государственного Университета в период с 14.10.18 по 01.12.19. Объектом исследования были выбраны самцы крыс линии Wistar, массой около 150 грамм. Животные содержались в виварии на полнорационной диете в соответствии с ГОСТом. Забой лабораторных животных производился путем декапитации.

Животные предварительно были разделены на четыре группы. Общий объем выборки – 49. Первая группа К- контрольная группа животных, которая не подвергалась внешним воздействиям. Вторая группа С - группа животных, подвергнутая действию стресса путем плавания в воде с грузом на хвосте вес которого составлял 3,5% от массы тела животного на протяжении 30 мин. Третья группа СЭ – животные, подвергнутые действию стресса путем физической нагрузки в течение 30 мин (плаванием), предварительно обработанные антихолинэстеразным препаратом, а именно ингибитором ХЭ эзеринном ((30aR,8aS)-1,3a,8-триметил-1H,2H,3H,3aH,8H,8aH-пирроло[2,3-b]индол-5-ил-N-метилкарбамата), введенным внутримышечно. Четвертая группа животных СП- группа животных, подвергнутая действию стресса путем физической нагрузки в течение 30 мин (плаванием), предварительно обработанная антихолинэстеразным препаратом прозеринном (N-(метадиметилкарбамоил-оксифенил), введенным внутримышечно. Доза введенных животным антихолинэстеразных препаратов 0,15 мкг/ кг массы тела, что не вызывает токсического действия на организм крыс. После декапитации все операции проводили на холоде (4°C). Из мозга выделяли кору больших полушарий (КБП), хвостатое тело (ХТ), серое вещество мозжечка, а также были выделены надпочечники и цельная кровь. Дозы для эзерина 0,15 мг/кг массы тела и прозерина 0,008 мг/кг массы тела животного.

Опыты проводились на смешанных микросомально-митохондриальных фракциях таких тканей, как КБП, ХТ, НП, с последующим осаждением ядер и

не разрушенных клеток путем центрифугирования, цельной крови и упакованных эритроцитах. Ткани разрушали в гомогенизаторе Поттера—Эльвейема в 9-кратном объеме 0.25 М раствора сахарозы на 0.02 М трис-НСI-буфере (рН 7.6 при 20°C). Полученные гомогенаты центрифугировали для удаления ядер и неразрушенных клеток при 1000д. Надосадочную жидкость, представляющую собой неочищенную мембранную фракцию, отбирали и сразу использовали для определения активности холинэстераз. Концентрация белка в грубых микросомально-митохондриальных фракциях для последующих расчетов определялась по методу Лоури. Калибровочная кривая строилась по результатам колориметрирования растворов белка с известной концентрацией. Определение активности АХЭ и БуХЭ производилось по методу Элмана. Сущность этого метода заключается в измерении образовавшегося тиохолина в результате ферментативного гидролиза АТХ и БуТХ, на основе реакции тиоловой группы с ионом DTNB. АСhE гидролизует ацетилтиохолин с образованием тиохолина и ацетата. Тиохолин, в свою очередь, восстанавливает нитробензоат, выделяющий дитиобис-нитробензойную кислоту. Следует отметить, что при работе с неочищенными ферментными препаратами (гомогенатами) определяется суммарная активность АХЭ и БуХЭ, когда используется ацетилтиохолин в качестве субстрата, так как БуХЭ так же способен использовать данное вещество в качестве субстрата, но гидролизует его менее эффективно в сравнении с АХЭ.

Для определения активности ХЭ по методу Элмана использовались:

1. Фосфатный буфер рН=8, приготовленный из 33,72 г Na_2HPO_4 + 1,65 г NaH_2PO_4 , которые доводят до 1 литра дистиллированной водой;
2. DTNB (5,5-дитио-bis-2-нитробензойная кислота) 0,001 М: 39,6 мг DTNB + 15 мг NaHCO_3 доводят до 100 мл 0,1 М фосфатным буфером рН=7;
3. Раствор АТХ 0,006 М- субстрат для АХЭ: 173,4 мг ацетилтиохолина йодида растворяют в 100 мл бидистиллированной воды;
4. Раствор БуТХ 0,006 М- субстрат для БуХЭ: 190,3 мг бутирилтиохолина йодида растворяют в 100 мл бидистиллированной воды;

5. 0,1% раствор прозерина: 10 мг прозерина доводят до 100 мл дистиллированной водой.

Приготовленные фосфатный буфер и растворы ингибиторов ХЭ хранятся в холодильнике, DTNB, АТХ и БуТХ – в морозильной камере и размораживаются непосредственно перед использованием. Для точности эксперимента растворы ингибиторов ХЭ обновляются перед каждым опытом, т.к. срок хранения данных растворов не превышает 3-5 дней с момента приготовления, остальные же обновляются по мере расхода.

Для проведения измерений по методу Элмана необходимо разводить гомогенаты для удобной и наглядной визуализации активности ХЭ посредством математических расчетов. Грубую микросомально-митохондриальную фракцию КБП и ХТ разводят фосфатным буфером рН = 8 в 500 раз, цельную кровь и упакованные эритроциты в 1000 раз, так как активность ХЭ в системе крови значительно превышает их активность в структурах мозга и других органах. Так, например, на 10 мл фосфатного буфера приходится 20 мкл грубой микросомально-митохондриальной фракции коры больших полушарий. Грубая микросомально-митохондриальная фракция НП разводится в 20 раз, но в данной работе были использованы и другие разведения, т.к. в некоторых опытах было получено небольшое количество гомогената данной ткани. Формула для расчета активности учитывает разведение тканей, поэтому активность ХЭ в надпочечниках можно считать актуальной. Каждую разведенную ткань отбирают в 3 пробирки по 3 мл, где 1 пробирка контрольная, две остальные – опытные параллельные пробы. В контрольную пробу приливают 200 мкл прозерина, для прекращения реакции спонтанного гидролиза.

Далее готовят реактив Элмана, который представляет собой смесь АТХ или БуТХ с раствором DTNB в пропорции 1:1. Приготовленный реактив добавляют в каждую пробу в размере 500 мкл, непосредственно перед внесением на водяную баню с интервалом в 15 сек. Пробы инкубируют 30 минут на водяной бане при температуре 37°C. После инкубации в опытные

параллельные пробы вносят ингибитор ХЭ прозерин в размере 200 мкл. Пробы с упакованными эритроцитами и цельной кровью после инкубации центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 минут для осаждения осадка из мембран эритроцитов. Все полученные пробы фотоколориметрируют на ФЭКе против дистиллированной воды при длине волны 412 нм. Контрольная проба показывает, сколько продукта образовалось в результате спонтанного гидролиза субстрата. Общий объем проб 3,5 мл.

Для определения эффективных концентраций эзерина и прозерина в микросомально-митохондриальной фракции КБП и упакованных эритроцитах мы так же использовали метод Элмана. Для данного опыта мы выбрали только контрольную К группу животных и использовали в дополнение к основным реактивам:

1. Раствор эзерина 10-3М: 13,7мг эзерина + 50 мл фосфатного буфера рН=8.
2. Раствор прозерина 10-3М: 15,2мг прозерина + 50 мл фосфатного буфера рН=8.

Из приготовленных растворов ингибиторов с концентрацией 10-3М поочередно готовят 12 следующих концентраций до 10-14М, приливая необходимое количество фосфатного буфера рН=8. В пробирки отбирают по 10 мл каждой концентрации от 10-3М до 10-14М, к которым приливают необходимое количество гомогената для достижения разведения, которое было описано выше. Следующий ход определения активности холинэстераз в грубой микросомально-митохондриальной фракции коры больших полушарий и упакованных эритроцитах крыс не изменяется и описан выше.

Метод Лоури для определения концентрации белков растворе характеризуется высокой чувствительностью (10 - 100 мкг белка в пробе) и основан на образовании цветных ароматических аминокислотных продуктов с реагентом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. На развитие окраски в пробе влияет большое количество веществ: компоненты буферов (например, Трис-буфер в концентрации 0,2 мМ), восстановители

(такие как цистеин, дитиотреитол в концентрации 0,01 - 0,4 мМ, аскорбиновая кислота), комплексоны (ЭДТА в концентрации 0,5 мМ), детергенты (Triton X100 в концентрации 0,1-0,2% вызывает осаждение), сульфат аммония в концентрации 0,15%, сахара в концентрации 10% и т. п. В связи с этим при составлении калибровочной кривой для определения белка по методу Лоури в растворителе для стандартного белка необходимо включить все компоненты, содержащиеся в анализируемых образцах.

Для определения белка по методу Лоури использовались:

1. 0,5 %-й раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-м цитрате натрия.
2. 2 %-й раствор Na_2CO_3 в 0,1 н. растворе NaOH .
3. Реактив А (готовится непосредственно перед работой): реактив 1 + реактив 2 в соотношении 1:50.
4. Реактив В: Реактив Фолина — Чокальтеу + бидистиллированная H_2O в соотношении 1:1.
5. Стандартный раствор белка с известной концентрацией.
6. Растворы белка неизвестной концентрации. В нашем случае такими растворами служат микросомально-митохондриальные фракции исследуемых тканей, за исключением цельной крови и упакованных эритроцитов.

Перед проведением опыта 1%-ые растворы микросомально-митохондриальных фракций КБП и ХТ разводят в 4 раза, в то время как 1%-ый раствор НП разведения не требует. В контрольную пробирку отбираем 0,1 мл дистиллированной воды, а в две опытные пробы отбираем по 0,1 мл исследуемого раствора гомогената. В каждую пробирку приливаем по 0,3 мл дистиллированной воды. Далее в каждую пробирку приливается по 2 мл реактива А и оставляем инкубироваться при комнатной температуре в течение 10 минут. По истечению срока инкубации к пробам добавляют по 0,2 мл реактива Б и встряхивают на шейкере и реакционную смесь оставляют инкубироваться при комнатной температуре в течение 30 минут.

Интенсивность проявленного цвета измеряют спектрофотометрически на длине волны 750 нм. Калибровочная кривая строится следующим образом:

оптическую плотность каждого из исследуемых растворов откладывают на график (калибровочную кривую), на котором нанесены известные концентрации по горизонтальной оси (ось X) и соответствующие оптические плотности по вертикальной оси (ось Y). Используя калибровочную кривую, определяют неизвестную концентрацию белка в исследуемом растворе, которая соответствует измеренному значению оптической плотности.

После всех произведенных опытов и измерений приступаем к расчетам активности XЭ в различных тканях, для этого мы использовали программное обеспечение «Microsoft Excel 2016» и «BioStat 8.0».

Активность AXЭ и БуXЭ рассчитывается по формуле (1):

$$AKT = \frac{E * 3,5 * 2 * P}{6000 * 1000 * 3}, \quad (1)$$

где E- значение экстинкции, соответствующее количеству окрашенного продукта, образовавшегося в результате действия фермента на субстрат в течение 30 мин (в данной формуле при пересчете на 1 час значение умножается на 2);

6000 – коэффициент молярной экстинкции реактива Элмана;

P – разведение;

3,5 - объем пробы, мл. Используется в формуле при пересчете с 1 литра, т.е 1000 мл посредством пропорции;

3- количество фермента, мл.

По данным фотоколориметрии, мы имеем значения экстинкции для контрольной E0 и опытных проб Ep. Чтобы получить E из полученных показаний, вычисляют среднее арифметическое опытных проб (E1п и E2п), а из этого значения вычитают значение экстинкции контрольной пробы E0. Активность AXЭ и БуXЭ показывает количество АТХ или БуXЭ в мкмолях, гидролизованного 1-им мл фермента за 1 час (мкмоль субстрата/мл гомогената/час).

Дальнейшие расчеты для КБП, ХТ и НП предполагают перерасчет активности АХЭ и БуХЭ на белок, содержащийся в грубой микросомальной фракции соответствующих тканей. Для этого получившееся значение АКТ делят на количество белка, определенного в смешанном мембранном препарате по методу Лоури. Для Э и ЦК это делать не требуется.

Далее для каждой ткани в каждой группе проводится статистическая обработка данных. Для этого с помощью программного обеспечения «BioStat 8.0» для каждой ткани каждой группы находят среднее арифметическое, определяется стандартная ошибка среднего и степень значимости. Эти показатели выявляют степень достоверности данных, т.е. наличие статистически достоверных различий активности исследуемых ферментов в группах животных, подверженных действию стресса и обработанных антихолинэстеразным препаратом, от активности контрольной группы животных.

На основе полученных данных делают вывод о наличии или отсутствии стрессовых изменений активности исследуемых ферментов в различных тканях крыс.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эзерин (или физостигмин) и прозерин (или неостигмин)-высокоэффективные ингибиторы обратимого действия из класса карбаматов, которые с различной эффективностью угнетают как АХЭ и БуХЭ [Species- and concentration..., с.5], блокируя эстеразный и анионный центры этой группы ферментов. Физостигмин, являясь по структуре третичным амином, способен проходить через гемато-энцефалический барьер, а так же стимулировать н- и м-ХР, за счет увеличения концентрации АХ в синаптической щели. Может оказывать централизованное действие при высоких дозах препарата [Triggle, Mitchell, Filler, с. 97]. Прозерин, является синтетическим аналогом физостигмина, по действию близок к физостигмину, однако будучи четвертичным амином и высокоионизированным при нормальном рН плазмы соединением, не проходит гематоэнцефалический барьер и не оказывает действия на ЦНС *in vivo* [Effects of stress..., с. 67].

В связи с тем, что нет четких представлений о различии антихолинэстеразной способности двух этих препаратов *in vivo*, мы исследовали активность холинэстераз в зависимости от концентрации данных ингибиторов

При исследовании активности холинэстераз в эритроцитах крыс в зависимости от концентрации используемого антихолинэстеразного препарата нами были получены данные представленные на рис. 1.

Из графика видно, что активность АХЭ полностью ингибируется при концентрациях эзерина и прозерина более чем десять в минус пятой степени моль. При концентрации ингибитора от десять в минус шестой степени до десять в минус восьмой степени моль активность АХЭ в эритроцитах крыс увеличивается. Меньшие концентрации ингибитора от десять в минус десятой степени до десять в минус четырнадцатой степени моль практически не угнетают активность АХЭ. Из графика видно, что прозерин при концентрациях от десять в минус шестой степени до десять в минус восьмой степени моль

достоверно ингибирует активность АХЭ в несколько раз эффективнее, чем эзерин. Этот график наглядно показывает высокое сродство выбранных нами ингибиторов к холинэстеразам эритроцитов крыс, что предполагает возможность их использования для специфической активации холинреактивных систем животных путем ингибирования активности холинэстераз *in vivo* при использовании эзерина и прозерина в дозах не вызывающих клинических проявлений интоксикации.

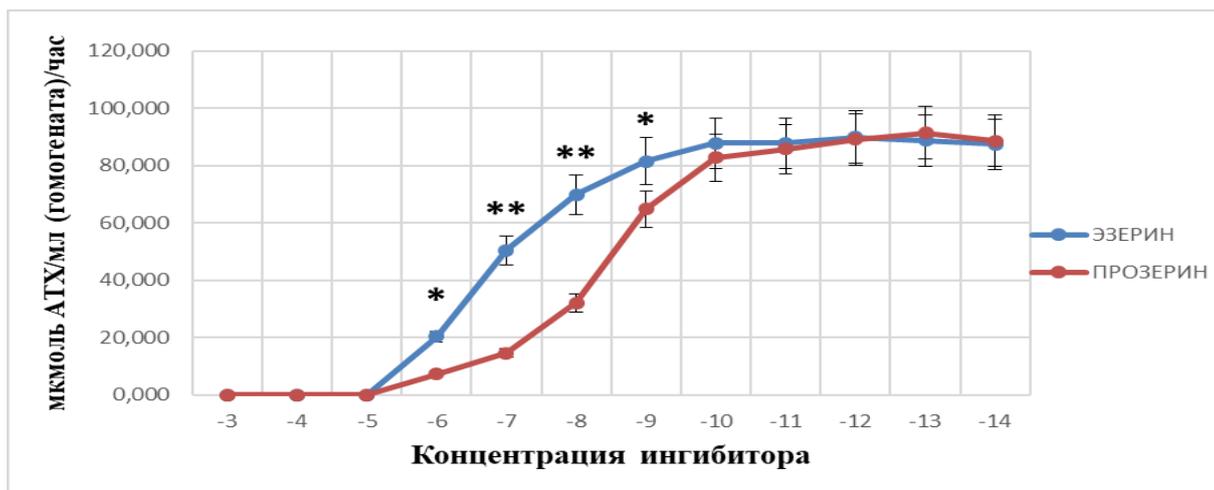


Рис. 1. Зависимость активности АХЭ от концентрации эзерина и прозерина в эритроцитах крыс. * - различия статистически достоверны при $p < 0.05$. ** - различия статистически достоверны при $p < 0,01$.

Примечание: объем выборки (n) = 19.

При исследовании активности холинэстераз в смешанной мембранной фракции коры больших полушарий (КБП) головного мозга крыс в зависимости от концентрации используемого антихолинэстеразного препарата нами были получены данные представленные на рис. 2. На графике показано, что при концентрации эзерина и прозерина более десяти в минус шестой степени моль активность АХЭ полностью подавляется. При концентрациях от 10^{-9} М до 10^{-14} М оба исследуемых антихолинэстеразных препарата практически не ингибируют активность АХЭ в коре больших полушарий. Из графика видно, что при концентрациях десять в минус седьмой степени до десяти в минус восьмой степени моль активность АХЭ в два раза выше при использовании в

качестве ингибитора эзерина, чем прозерина при соответствующих концентрациях.

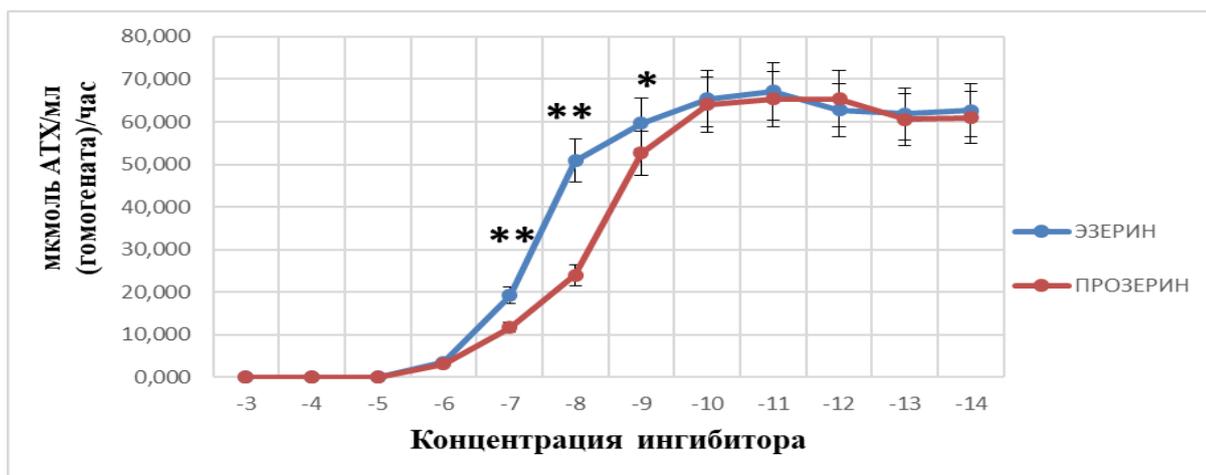


Рис. 2. Зависимость активности АХЭ от концентрации эзерина и прозерина в коре больших полушарий крыс. * - различия статистически достоверны при $p < 0.05$. ** - различия статистически достоверны при $p < 0,01$.

Примечание: объем выборки (n) = 10.

Из литературных источников известно, что при воздействии стрессов могут происходить изменения активности и экспрессии ХЭ в ЦНС и периферических отделах нервной системы. Было показано, что воздействие химических или физических стресс-факторов индуцирует синтез АХЭ, повышается концентрация фермента после воздействия фактора на некоторое время [58]. В отношении БуХЭ так же сообщаются схожие данные. Было отмечено значительное увеличение концентрации БуХЭ в плазме крови у людей, стрессором для которых является предоперационная тревога [Pseudocholinesterase activity increases..., с.290].

Для диагностики состояния стресса в наших исследованиях мы использовали определение в надпочечниках контрольной и опытной групп животных концентрации аскорбиновой кислоты, которая, как известно, выполняет роль кофермента в процессе синтеза катехоламинов. По данным литературы наблюдается тесная корреляция ее концентрации в надпочечниках с повышением гормонов стресса в плазме крови [Маслова, В.К. Климова, с. 463]. Нами было обнаружено достоверное снижение концентрации аскорбиновой

кислоты в надпочечниках крыс, подвергнутых действию стресса. При этом в группах животных, подвергнутых действию стресса и обработанных любым из представленных антихолинэстеразных препаратов, достоверного снижения концентрации в сравнении с контролем не обнаружено. Данные представлены на рис.3.

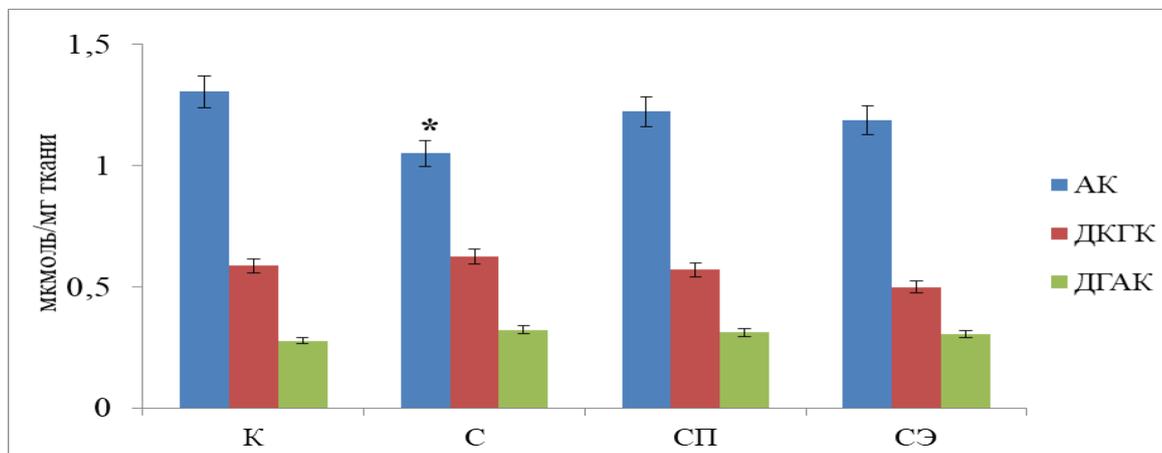


Рис.3. Концентрация аскорбиновой кислоты (АК) в надпочечниках крыс.

Примечание: Примечание: АК – восстановленная форма аскорбиновой кислоты; ДАК – дегидроаскорбиновая кислота; ДКГК – дикетогулоновая кислота. К- контрольная группа животных, С- группа, животных подвергнутая действию стресса. С+Э- группа животных, подвергнутая действию стресса, предварительно обработанная эзеринном. * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0.05$. Объем выборки (n) = 8. Для оценки возможного влияния стресса и антихолинэстеразного препарата непосредственно на холинреактивные системы надпочечников опытных групп животных мы проводили исследование активности холинэстераз в смешанной мембранной фракции полученных из этих органов. Полученные результаты представлены на рис. 4.

Из приведенных ниже данных следует, что активность АХЭ в НП крыс группы, подвергнутой действию стресса, предварительно обработанной эзеринном(СЭ), достоверно снижается в сравнении с контрольной группой животных. Достоверные различия между активностью АХЭ в смешанной мембранной фракции надпочечников в группе животных, подвергнутых действию стресса(С) и группе животных, подвергнутых действию стресса и

обработанных прозерином(СП) по сравнению с контролем не выявлены. Уменьшение активности АХЭ повышает уровень АХ, который по преганглионарным синаптическим нервным волокнам стимулирует выработку катехоламинов надпочечниками и повышает выработку гипофизом АКТГ [Биохимия человека, с. 289]. Эти вещества являются ключевыми в развитии стресс-реакции. У нас нет снижения аскорбиновой кислоты в группах СП и СЭ.

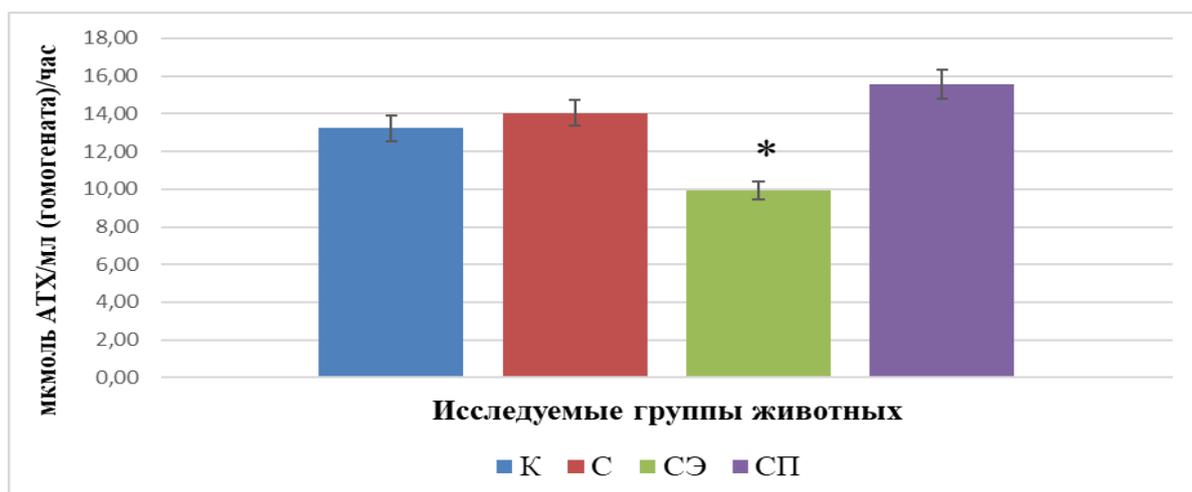


Рис. 4. Активность АХЭ в надпочечниках (НП) крыс.

Примечание: К- контрольная группа животных. С - группа животных подверженная действию стресса. СЭ - группа животных, подвергнутая действию стресса, предварительно обработанная эзеринном. СП - группа животных, подвергнутая действию стресса, предварительно обработанная прозеринном. * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0.05$. Объем выборки $n = 9$.

Мы провели исследование активности АХЭ в цельной крови и эритроцитах. Так как методика получения упакованных эритроцитов подвергает эритроциты неоднократной отмывке, ингибирование АХЭ в данных структурах должно быть менее эффективно, чем в цельной крови. Данные об активности АХЭ в цельной крови и упакованных эритроцитах крыс, подвергнутых действию стресса, предварительно обработанных антихолинэстеразными препаратами и подвергнутых действию стресса и контрольной группы животных представлены в табл 1.

Выявлено статистически достоверное повышение активности АХЭ в эритроцитах крыс, подвергнутых действию стресса, в сравнении с контрольной группой животных. Достоверных различий в активности АХЭ между группами СЭ, СП и К в эритроцитах крыс не было выявлено. Точная функция холинэстераз в эритроцитах неизвестна, однако предполагается, что она необходима в случае поступления большого количества ацетилхолина в кровяное русло, т.к. АХ обладает токсическим действием в случае избытка. Достоверных показателей различия между активностью АХЭ в цельной крови крыс, подверженных действию стресса обработанных и не обработанных антихолинэстеразными препаратами и активностью АХЭ контрольной группы животных не выявлено.

Таблица 1

Активность периферических АХЭ в цельной крови (ЦК) и эритроцитах (Э) крыс.

Ткань / Группа	К	С	СЭ	СП
Э	93,68 ± 9,96	131,09 ± 11,43 *	105,33 ± 7,53	82,56 ± 2,90
ЦК	112,55 ± 12,53	114,20 ± 13,43	109,33 ± 5,27	100,22 ± 11,76

Примечание: К- контрольная группа животных. С - группа животных подверженная действию стресса. СЭ - группа животных, подвергнутая действию стресса, предварительно обработанная эзеринном. СП - группа животных, подвергнутая действию стресса, предварительно обработанная прозеринном внутримышечно. * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0.05$. Объем выборки: $n = 14$.

Известно, что эзерин как третичное аммонийное соединение проникает через гематоэнцефалический барьер, в отличие от своего аналога прозерина, являющегося четвертичным амином, при этом резкий психологический стресс, вызванный вынужденным плаванием, может нарушать работу гематоэнцефалического барьера, что облегчает проникновение в структуры

мозга антихолинэстеразных препаратов [Darvesh, Hopkins, Geula, с.135]. В связи в этом мы произвели измерения активности ХЭ в различных тканях головного мозга (КБП и ХТ) крыс в четырех группах животных. На рис. 5 ниже приведены данные полученные нами в ходе определения активности АХЭ в КБП головного мозга крыс групп К, С, СЭ и СП.

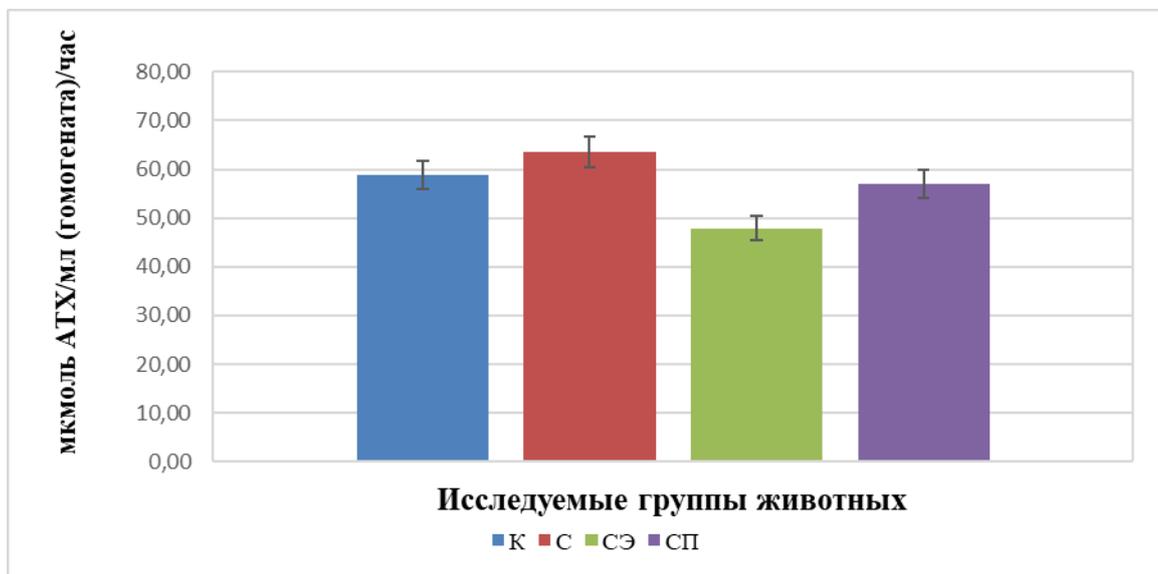


Рис. 5. Активность АХЭ в КБП головного мозга крыс.

Примечание: КБП – кора больших полушарий. К- контрольная группа животных. С - группа животных, подвергнутая действию стресса. СЭ - группа животных, подвергнутая действию стресса, предварительно обработанная эзеринном. СП - группа животных, подвергнутая действию стресса, предварительно обработанная прозеринном. * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0.05$. Объем выборки $n = 14$.

Из рисунка видно, что нами не отмечено изменений активности исследуемого фермента в грубой микросомально-митохондриальной фракции коры больших полушарий головного мозга крыс, подвергнутых действию стресса, как обработанных, так и не обработанных антихолинэстеразным препаратом по сравнению с группой контроля.

На рис. 6 приведены данные об активности АХЭ в хвостатом теле головного мозга крыс в группах К, С, СЭ и СП. График наглядно демонстрирует, что активность АХЭ в смешанной мембранной фракции, полученной из хвостатого тела(ХТ) головного мозга крыс, в группе животных,

подвергнутых действию стресса и предварительно обработанных эзеринном(СЭ) достоверно снижается в сравнении с активностью АХЭ в контрольной группе. Достоверных различий в активности АХЭ в мембранной фракции хвостатого тела(ХТ) головного мозга крыс в группе животных, подвергнутых действию стресса(С) и группе животных, подвергнутых действию стресса и предварительно обработанных прозеринном(СП) не наблюдалось в сравнении с контрольной группой животных.

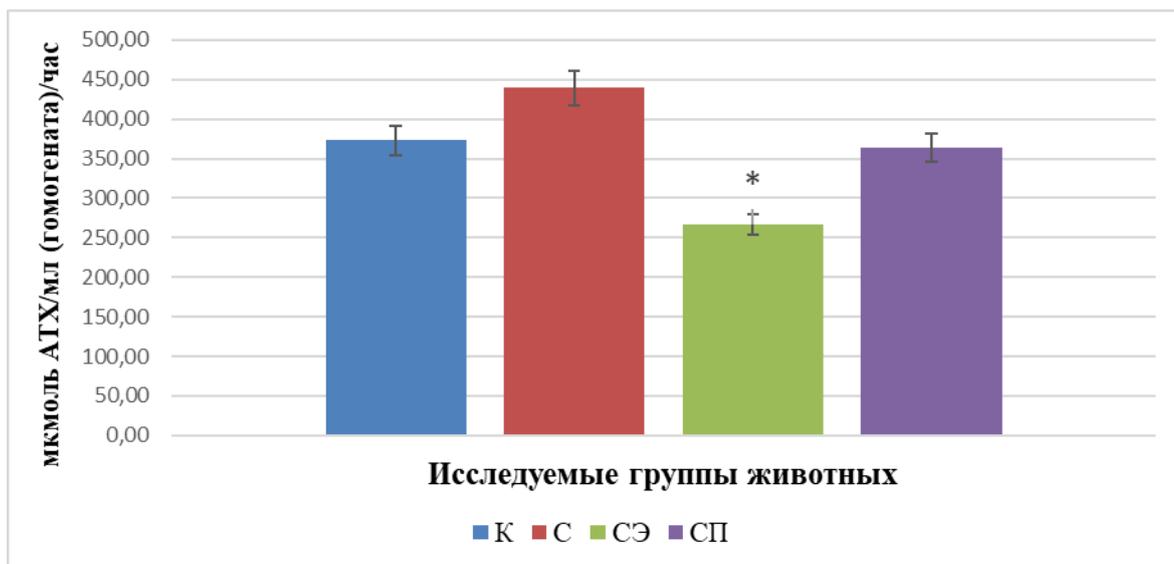


Рис.6. Активность АХЭ в хвостатом теле (ХТ) головного мозга крыс.

Примечание: К- контрольная группа животных. С – группа, животных подвергнутая действию стресса. СЭ - группа животных, подвергнутая действию стресса, предварительно обработанная эзеринном. СП - группа животных, подвергнутая действию стресса, предварительно обработанная прозеринном. * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0.05$.

Объем выборки (n) = 11.

Известно, что в отличие от АХЭ, БуХЭ выполняет скорее регуляторную функцию холинергической системы, хотя в условиях отсутствия или полной дисфункции АХЭ, этот фермент может компенсировать действие АХЭ, за счет способности к гидролизу ацетилхолина [26, 62]. Считается, что т.н. ложная холинэстераза присутствует в сыворотке крови, а также печени и поджелудочной железе, но последние исследования так же предполагают

наличие этого фермента в других тканях, в том числе и некоторых нейронах ЦНС [19].

Из всех использованных для исследования тканей нами выявлена бутирилхолинэстеразная активность только в плазме, результаты представлены на рис. 7.

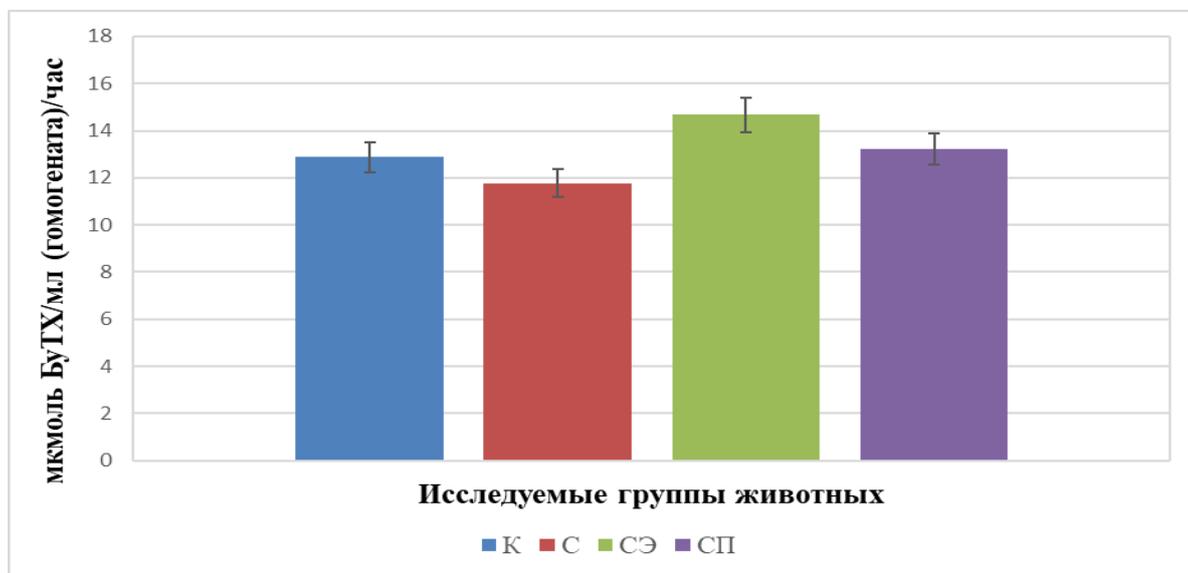


Рис. 7. Активность периферических ХЭ в плазме(П) крыс.

Примечание: К - контрольная группа животных. С - группа животных, подвергнутая действию стресса. СЭ - группа животных, подвергнутая действию стресса, предварительно обработанная антихолинэстеразным препаратом эзеринном. СП - группа животных, подвергнутая действию стресса, предварительно обработанная прозеринном. * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0.05$. Объем выборки: $n = 9$.

Достоверных различий по активности БуХЭ в эритроцитах крыс, подвергнутых действию стресса (физической нагрузки), и группой контроля не обнаружено вне зависимости от обработки антихолинэстеразным препаратом.

Таким образом, можно отметить что антихолинэстеразные препараты, вводимые опытным животным перед стрессовым воздействием, несмотря на использование в малой дозе (без клинических проявлений интоксикации) все же оказали, по-видимому, существенное влияние на развитие адаптивных стрессовых реакций у животных прежде всего за счет угнетения активности холинэстераз в надпочечниках и хвостатом теле головного мозга крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Исследование активности холинэстераз от концентрации ингибиторов выявило, что оба антихолинэстеразных препарата дозозависимо влияют на активность исследуемого фермента в смешанной мембранной фракции коры больших полушарий и эритроцитов крыс. При этом можно отметить более низкие значения выявляемой активности фермента при использовании прозерина по сравнению с эзеринном.
2. Нами отмечено, что на фоне введения обоих антихолинэстеразных препаратов в группах животных, подвергнутых действию стресса, происходит существенное снижение стресс-реактивности надпочечников, что выражается отсутствием снижения концентрации аскорбиновой кислоты в мозговом веществе надпочечников у этой группы опытных животных.
3. Выявлено снижение активности холинэстераз смешанной мембранной фракции надпочечников животных в группе, подвергнутой действию стресса после воздействия антихолинэстеразного препарата – эзерина.
4. Исследование активности холинэстераз в упакованных эритроцитах и цельной крови животных, подвергнутых действию стресса после обработки антихолинэстеразными препаратами не выявило достоверных изменений активности фермента. При этом отмечается достоверное увеличение его активности у животных, не обработанных ингибиторами холинэстераз.
5. Исследование активности холинэстераз ЦНС выявило достоверное снижение активности фермента в смешанной мембранной фракции хвостатого тела группы животных, обработанных эзеринном по сравнению с контрольной группой.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Acetylcholine nicotinic receptors: finding the putative binding site of allosteric modulators using the “blind docking” approach / B. Iorga, D. Herlem, E. Barre [et al] // *Journal of Molecular Modeling*. 2006. Vol. 12. №3. P. 366-372.
2. Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contributions of its hydrolytic capacity, core protein, and variable C termini / Sternfeld M., Ming G.L., Song H.J. [et al] // *J Neurosci*, 1998. P. 1240-1249.
3. Acetylcholinesterase inhibitor pretreatment alters stress-induced expression of acetylcholinesterase transcripts in the mouse brain / A. Dori, S. Oriel, U. Livneh [et al] // *Neuroscience*. 2011. V.183. P.90-98.
4. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression / D. Kaufer, A. Friedman, S. Seidman [et al] // *Nature*. 1998. Vol. 393. P. 373-377.
5. Bosak A., Katalinic M., Kovarik Z. Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicaja // *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2011. Vol. 62. P. 175-190.
6. Chatonnet A., Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase // *Biochem. J*. 1989. Vol. 260. №3. P. 625-634.
7. Cholinergic mechanism function and dysfunction / I. Silman [et al]. London: CRC Press. 2004. 774 p.
8. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complex with substrate and products / Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson [et al] // *The Journal of biological chemistry*. 2003. Vol. 278. P.41141-41147.
9. Damped oscillatory hysteretic behavior of butyrylcholinesterase with benzoylcholine as substrate / P. Masson, B.N. Goldstein, J.C. Debouzy [et al] // *Eur. J. Biochem*. 2004. Vol.271. P. 220-234.
10. Darvesh S., Hopkins N.S., Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase // *Nat Rev Neurosci*. 2003. Vol. 4. P. 131-138.

11. Day J., Dansma G., Fibiger H.C. Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study // *Pharmacol biochem behave.* 1991. Vol. 38. C. 9-12.
12. Does "butyrylization" of acetylcholinesterase through substitution of the six divergent aromatic amino acids in the active center gorge generate an enzyme mimic of butyrylcholinesterase? / D. Kaplan, A. Ordentlich, D. Barak [et al] // *Biochemistry.* 2001. Vol. 40. №25. P. 7433-7445.
13. Effects of stress pretreatment on the dynamics of blood cholinesterase activity after exposure to an organophosphorus pesticide in the rat / S. Gralewicz, R. Świercz, P. Lutz [et al] // *Ann Agric Environ Med.* 2010. №17. P.65-71.
14. Expression of three alternative acetylcholinesterase messenger RNAs in human tumor cell lines of different tissue origins / Karpel R., B. Aziz-Aloya, R. Sternfeld [et al] // *Exp Cell Res.* 1994. P. 210-268.
15. Fitzpatrick-Mcelligott S., Stent G.S. Appearance and localization of acetylcholinesterase in embryos of the leech *Helobdella triserialis* // *J. Neurosci.* 1981. P. 901-907.
16. Frieden C. Slow transitions and hysteretic behavior in enzyme // *Ann. Rev. Biochem.* 1979. Vol.48. P.471-490.
17. Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuroligin in mammalian neuritogenesis / Grifman M., Galyam N., Seidman S. [et al] // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998. P. 13935-13940.
18. Harel M., Sussman J.L., Krejci E. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. № 89. P. 10827-10831
19. Hydrolysis of oxo- and thio-esters by human butyrylcholinesterase / P. Masson, M.T. Froment, E. Gillon [et al] // *Biochim Biophys Acta.* 2007. Vol. 1774. P. 16-34
20. Hysteresis of insectacetylcholinesterase / A. Badiou, M.T. Froment, D. Fournier [et al] // *Chemico-Biological Interactions.* 2008. Vol. 175(1-3). P. 410-412.

21. Kawashima K., Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes // *Pharmacol Ther.* 2000. P. 29-48
22. Kinetic analysis of butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetanilides / P. Masson, M.T. Froment, E. Gillon [et al] // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2007. Vol. 1774. P. 1139-1147.
23. Kinetic manifestations of allosteric interactions in models of regulatory enzymes with indirect co-operativity / B.I. Kurganov, Z.S. Kagan, A.I. Dorozhko [et al] // *J. Theor. Biol.* 1974. Vol. 47. № 1. P. 1-41.
24. Klein J., Loffeholz K. Cholinergic Mechanism: from molecular biology to clinical significance // Amsterdam: Elsevier Science B.V. 1996. 376 p.
25. Koenigsberger C., Chiappa S., Brimijoin S. Neurite differentiation is modulated in neuroblastoma cells engineered for altered acetylcholinesterase expression // *J Neurochem.* 1997. P. 1389-1397.
26. Lionetto M.G., Cariacto R., Calisi A. Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives // Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. 2013. P. 8.
27. Masson P., Lockridge O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior // *Arch. Biochem. Biophys.* 2010. Vol. 494. № 2. P. 107-120.
28. Massoulie J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases // *Neurosignals.* 2002. Vol. 11. №3. P. 130-143.
29. Meshorer E., Soreq H. Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies // *Trends in Neurosciences.* 2006. V.29. №4. P.216-224.
30. Molecular and cellular biology of cholinesterases / J. Massoulie, L. Pezzementi, S. Bon [et al] // *Prog neurobiol.* 1993. Vol. 41. P. 31-91.
31. Neet K.E., Ainslie R.G. Hysteretic enzymes // *Meth. Enzymol.* 1980. Vol. 64. P. 192-226.

32. Old and new questions about cholinesterases / J. Massoulié, N. Perrier, Noureddine H. [et al] // *Chem Biol Interact.* 2008. Vol. 75. P. 30-44.
33. Park S.E., Kim N.D., Yoo Y.H. Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation // *Cancer Research.* 2004. V.64. №24. P.2652-2655.
34. Pseudocholinesterase activity increases and heart rate variability decreases with preoperative anxiety / T. Ledowski, B. Bein, R. Hanss [et al] // *European journal of anaesthesiology.* 2005. V.22. №4. P.289-292.
35. Rat butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of N-alkyl homologues of benzoylcholine / A. Hrabovska, J. Debouzy, J.C. Froment [et. al] // *FEBS J.* 2006. Vol. 273. P.1185-1197.
36. Reaction of cresyl saligen phosphate, the organophosphorus agent implicated in aerotoxic syndrome with human cholinesterases: mechanistic studies employing kinetics, mass spectrometry and X-ray structure analysis Schopfer / E. Carletti, L.M. Colletier, J.P. Froment [et al] // *Chem. Res. Toxicol.* 2011. Vol 24. P. 797-808
37. Reduced acetylcholine receptor density, morphological remodeling, and butyrylcholinesterase activity can sustain muscle function in acetylcholinesterase knockout mice / M. Adler, H.A. Manley, A.L. Purcell [et al] // *Muscle Nerve.* 2004. Vol. 30. №3. P. 317-327.
38. Reid G.A., Chilukuri N., Darvesh S. Butyrylcholinesterase and the cholinergic system // *Neuroscience.* 2013. № 234. P. 53-68.
39. Silman I., Sussman J.L. Acetylcholinesterase: how is structure related to function? // *Chem. Biol. Interact.* 2008. Vol. 175. P. 3-10.
40. Soreq H., Seidman S. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor // *Neuroscience.* 2001. P. 294-302.
41. Species- and concentration-dependent differences of Acetyl and Butyrylcholinesterase sensitivity to physostigmine and neostigmine / D.I. Bitzinger, M. Gruber, S. Tümmler [et al] // *Neuropharmacology.* 2016. P. 1-18.
42. Stepankova S., Komersb K. Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors // *Current Enzyme Inhibition.* 2008. Vol. 4. №. 4. P.160-171.

43. Strain and regional dependence of alternate splicing of acetylcholinesterase in the murine brain following stress or treatment with diisopropylfluorophosphate / U. Livneh, A. Dori, A. Katzav [et al] // Behavioural brain research. 2010. V.210. №1. P.107-115.

44. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology/ D. Grisaru, M. Sternfeld, A. Eldor [et al] // European Journal of Biochemistry. 1999. V. 264. №3. P.672-686.

45. Taylor P., Radic Z. The cholinesterases: from genes to proteins // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 1994. Vol. 34. P. 281-320.

46. The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo / N.A. Perrier, M. Salani, C. Falasca [et al] // J. Neurochem. 2005. Vol. 94. P. 629-638.

47. Tougu V. Acetylcholinesterase: Mechanism of catalysis and inhibition. A review // CurrMedChem. 2001. Vol.1. P. 155-170.

48. Triggle D.J., Mitchell J.M., Filler R. The Pharmacology of Physostigmine // CNS Drug Reviews. 1998. Vol. 4. №. 2. P. 87-136.

49. Vigny M., Gisiger V., Massouli J. «Nonspecific» cholinesterase and acetylcholinesterase in rat tissues: molecular forms, structural and catalytic properties, and significance of the two enzyme systems // PNAS USA. 1978. Vol. 75. P. 2588-2592.

50. Агаджанян Н.А., Смирнов В.М. Нормальная физиология: Учебник для студентов медицинских вузов. Москва: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2009. 520 с.

51. Аракелов Г.Г. Стресс и его механизмы // Вестник Московского университета. 1995. № 4. С. 45-54.

52. Белова Е. И. Основы нейрофармакологии: Учеб. пособие для студентов вузов. Москва: Аспект Пресс, 2006. 176 с.

53. Биохимия человека Т.1 / Р. Марри [и др.]. Москва: Мир, 1993. 384 с.

54. Голиков С.Н., Розенгарт В.И. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. Ленинград: Медицина, 1964. с. 382.

55. ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. Дата введения 2016-07-01. Москва: Стандартинформ, 2019. 24 с.
56. Клайн В. Успехи стереохимии: пер. с англ. Москва: Госхимиздат, 1961. 744 с.
57. Косицкий Г.И. Физиология человека. Москва: Медицина, 1985. 544 с.
58. Литвиненко И.В. Нарушения сна и памяти, ацетилхолин при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, применение пролонгированной формы галантамина // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2012. № 2. С. 100-104.
59. Майский В.В. Элементарная фармакология: учебное пособие. Москва: Фарма Диалог, 2009. 543 с
60. Маслова М.Н., Климова М.К. Гипербора́ция и стресс // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2012. Т. 48. №5. С. 461- 466
61. Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке: в 3 т. Т 3. Москва: Мир, 1980. 488 с.
62. Нейрохимия: учеб. пособие для вузов / А.А. Болдырев [и др.]. Москва: Дрофа, 2010. 398 с.
63. Нейрохимия: учебник для биологических и медицинских вузов / И.П. Ашмарин, А.Е. Антипенко, В.В. Ашапки́н [и др.]. Москва: Изд. Института биомедицинской химии РАМН, 1996. 470 с.
64. Николлс Дж., Мартин Р., Валлас Б. От нейрона к мозгу: пер. с англ. Москва: Едиториал УРСС, 2003. 672 с.
65. Омелянчик В.Н., Новосад Н.В., Колесник Н.В. Параметры суточных ритмов активности ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в печени животных с разными фазами активности // Вестник Запорожского национального университета. 2014. № 2. С. 171-176.

66. Основы физиологии человека: учебник для студентов вузов, обучающихся по медицинским и биологическим специальностям / Н.А. Агаджанян [и др.]. Москва: РУДН, 2001. 408 с.

67. Петров К.А., Харламова А.Д.Б Никольский Е.Е. Холинэстеразы: взгляд нейрофизиолога // Гены и клетки. 2014. Т 9. № 3. С 160-167.

68. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме: пер. с англ. Москва: Медгиз, 1960. 254 с.

69. Сравнительный анализ каталитической активности высокоочищенной бутирилхолинэстеразы человека в нативной и конъюгированной с наночастицами золота формах в опытах *in vivo* / О.И. Соколов [и др.] // Вестник ВолгГМУ. 2017. №4. С. 90-95.

70. Страйер Л. Биохимия: пер. с англ. в 3 т. Т 3. Москва: Мир, 1985. 400 с.

71. Судаков К.В. Индивидуальная устойчивость к эмоциональному стрессу. Москва: Горизонт, 1998. 263 с.

72. Тютюнщикова В.Д. О возможном действии ацетилхолина в вегетативном ганглии на доступность межклеточного пространства для неполярных веществ // Вопросы образования и науки: теоретические и практические аспекты: материалы Международной научно-практической конференции НИЦ «Поволжская научная корпорация», 25 декабря 2015 г. Самара: ООО «Офорт», 2015. С. 374-377.

73. Хухо Ф. Нейрохимия: Основы и принципы: пер. с англ. Москва: Мир, 1990. 384 с.

74. Яковлев В.А. Кинетика ферментативного катализа. Москва: Издательство «Наука», 1965. 247 с.