

*На правах рукописи*

МОХАММЕД МУСТАФА ТАХА

**ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ И ДАЛАРГИНА НА АКТИВНОСТЬ  
Na, K-АТФазы И АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ СИНАПТИЧЕСКИХ  
МЕМБРАН МОЗГА КРЫС ПРИ ИШЕМИИ**

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2011

Работа выполнена на кафедре биохимии и биофизики Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Дагестанский государственный университет»

**Научный руководитель** – доктор биологических наук, профессор  
**Кличханов Нисред Кадинович**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Конторщикова Клавдия Николаевна**

доктор медицинских наук, профессор  
**Перетягин Сергей Петрович**

**Ведущая организация:** ГОУ ВПО «Нижегородская государственная  
медицинская академия»

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г. в \_\_\_\_\_ ч.  
на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1, биологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. E-mail: [kfg@bio.unn.ru](mailto:kfg@bio.unn.ru), факс: (831) 4652303

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук, доцент

С. В. Копылова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Проблема ишемических поражений головного мозга является одной из наиболее актуальных в современной неврологии. Ее медико-социальная значимость определяется большим весом сосудистых заболеваний головного мозга в структуре заболеваемости и смертности населения, а также высокими показателями временной нетрудоспособности и первичной инвалидности (Верещагин, Суслина, 2003, Гусев и др., 2007). В связи с этим изучение патогенеза и способов коррекции ишемического поражения головного мозга представляется важным как с теоретической, так и с практической точки зрения.

Нарушения кровоснабжения головного мозга инициируют каскад биохимических реакций, лежащих в основе тканевого повреждения. Основные механизмы нейрональных повреждений включают истощение энергетических ресурсов в условиях ацидоза ткани мозга, нарушение ионного гомеостаза, избыточное накопление возбуждающих аминокислот, обладающих нейротоксическим действием, и возрастание активных форм кислорода (АФК), индуцирующих развитие окислительного стресса (Гусев, Скворцова, 2002; Fiskum et al., 2004; Szydłowska, Tymianski, 2010). Образующиеся при этом АФК способствуют окислительной модификации не только мембранных липидов, но и цитозольных и мембранных белков нервных клеток. Высокой чувствительностью к АФК обладают такие важнейшие ферменты синаптических мембран как Na, K-АТФаза и ацетилхолинэстераза (АХЭ). Ишемия мозга приводит к снижению активности Na, K-АТФазы (Dobrota et al., 1999), в результате чего нарушается транспорт ионов, развивается деполяризация мембраны, нейроны утрачивают свою важнейшую функцию – электрическую проводимость. Вместе с тем не совсем ясно как изменяется активность Na, K-АТФазы мембран синапсом в динамике неполной глобальной ишемии и в ближайшем постишемическом периоде.

АХЭ является одним из основных компонентов холинергической системы мозга. Фермент в нейронах головного мозга расположена на внешней поверхности постсинаптической мембраны холинергических синапсов, где регулирует временной профиль концентрации медиатора ацетилхолина в синаптической щели (Zimmerman, Soreq, 2006). Установлено, что повреждение нейронов, связанное с ишемией, сопровождается изменениями в холинергической системе (Kataoka et al., 1991). Однако нет единого мнения относительно того, как влияет ишемия на активность АХЭ в мозге (Saez-Valero et al., 2003; Hu et al., 2009).

В настоящее время многие вопросы, связанные с механизмами защиты головного мозга от окислительного стресса в условиях ишемии и рециркуляции, остаются невыясненными. Является очевидной необходимостью как систематических исследований биологического действия природных и синтетических антиоксидантов, так и поиск новых соединений, обладающих протекторной способностью к нарушениям кислородного обмена. В этой связи интерес представляет синтетический аналог природного лей-энкефалина D-

Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>, Arg<sup>6</sup>-энкефалин – даларгин. Этот пептид активирует опиоидные  $\mu$ - и  $\delta$ -рецепторы и проникает через гематоэнцефалический барьер только при его использовании в дозах не менее 0,5 мг/кг (Полонский и др., 1987; Лишманов, Маслов, 1994). В экспериментах на животных (Маслов и др., 2002) и в клинических условиях (Казанцев и др., 2000) даларгин оказывал противоишемическое действие, но механизмы такого действия пептида не изучены.

Известно, что устойчивость мозга к дефициту кровоснабжения может повышаться при снижении температуры тела (Liu, Yenari, 2007; Yenari et al., 2008; van der Worp et al., 2010). Особенно эффективным является мягкая гипотермия. Механизмы протекторного действия гипотермии весьма разнообразны. Они сопряжены с уменьшением эксайтотоксичности глутамата, ограничением кальциевой перегрузки клеток в очаге ишемии. В связи с этим представляет интерес исследование влияния мягкой гипотермии на активность мембранных ферментов и интенсивность свободнорадикальных процессов в синапсах.

**Цель работы.** Целью данной диссертационной работы является изучение активности мембранных ферментов и свободнорадикальных процессов в синапсах при ишемии/реперфузии головного мозга крыс до и после коррекции нарушений даларгинем и гипотермией.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить активность Na, K-АТФазы и АХЭ мембран синапсом из коры головного мозга крыс при окклюзии сонных артерий разной длительности и реперфузии.

2. Изучить влияние даларгина и гипотермии на активность Na, K-АТФазы и АХЭ мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии.

3. Исследовать интенсивность окислительной модификации липидов и белков мембран синапсом при ишемическом поражении головного мозга.

4. Исследовать защитный эффект даларгина и гипотермии в отношении свободнорадикального окисления липидов и белков мембран синапсом при ишемии.

5. Изучить влияние ишемии головного мозга на состояние антиоксидантной системы защиты синапсом (восстановленного глутатиона, активности СОД и каталазы).

6. Исследовать защитное действие даларгина и гипотермии в отношении антиоксидантной системы (восстановленного глутатиона, активности СОД и каталазы) синапсом мозга при ишемии у крыс.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Двусторонняя окклюзия сонных артерий приводит к повреждению мембран синапсом из коры головного мозга крыс, ингибируя важнейшие ферменты мембран синапсом – Na, K-АТФазу и АХЭ, увеличивая окислительную модификацию мембранных липидов и белков, подавляя активность антиоксидантной защиты синапсом.

2. Опиоидный гексапептид даларгин оказывает эффективное нейропротекторное действие при острой ишемии/реперфузии головного мозга у экспериментальных животных. Это подтверждается не только положительной динамикой соответствующих биохимических показателей окислительной модификации мембранных липидов и белков синапсом, повышением активности антиоксидантной защиты, но и защитой мембранных ферментов Na, K-АТФазы и АХЭ от ингибирования.

3. Мягкая гипотермия уменьшает выраженность повреждения мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии/реперфузии, но существенно подавляет антиоксидантную защиту.

**Научная новизна исследования.** Установлено, что активность Na, K-АТФазы и АХЭ мембран синапсом из коры головного мозга при неполной глобальной ишемии снижается, а в период реперфузии возрастает. Впервые показано, что снижение активности Na, K-АТФазы и АХЭ мембран синапсом усиливается при увеличении длительности нарушения мозгового кровообращения. Впервые установлено, что даларгин снижает повреждающее влияние двусторонней окклюзии сонных артерий на синаптические окончания нейронов мозга путем активации антиоксидантной системы защиты, в результате чего происходит уменьшение накопления продуктов перекисления липидов и белков, т.е. нарушение клеточных мембран, что, в свою очередь положительно отражается на активности Na, K-АТФазы и АХЭ мембран. Получены конкретные значения доз даларгина, проявляющих и не проявляющих выявленные эффекты.

Впервые установлено, что мягкая гипотермия защищает Na, K-АТФазу и АХЭ мембран синапсом от ингибирования при ишемии и одновременно подавляет активность антиоксидантной защиты синапсом.

В результате экспериментальных исследований сформулированы представления о патогенетической значимости окислительного стресса в повреждении синаптических мембран и обосновано применение даларгина и гипотермии в качестве нейропротекторов при ишемическом повреждении мозга.

**Теоретическая значимость работы.** Полученные в работе результаты доказывают участие окислительного стресса в развитии ответа ткани мозга на нарушения мозгового кровообращения, что является существенным вкладом в понимании патогенеза ишемических повреждений головного мозга. Проведенные исследования указывают на то, что окислительные повреждения мембран синапсом начинаются уже на ранних этапах окклюзии сонных артерий и постепенно усиливаются по мере развития тяжести ишемии.

Полученные данные расширяют представления о роли энкефалинов в регуляции устойчивости мозга к ишемии. Результаты проведенного исследования доказывают эффективность использования даларгина в комплексной терапии острых нарушений мозгового кровообращения.

**Практическая значимость работы.** Ишемия мозга и ее последствие – ишемический инсульт являются тяжелейшими формами сосудистых поражений мозга, занимающая одно из первых мест в структуре общей смертности населения и являющаяся лидирующей причиной инвалидизации. В связи

с этим поиск способов коррекции ишемии представляется важным для фундаментальной и практической медицины. Гипотермия является одним из потенциальных терапевтических подходов к защите мозга в клинической неврологии у больных с инсультом и травмами мозга. Понимание механизмов этого феномена может дать основу для создания фармакологических препаратов, предназначенных для предупреждения последствий ишемического поражения мозга.

**Внедрение результатов работы в практику.** Основные результаты работы внедрены в учебный процесс в виде методических разработок для проведения практических и семинарских занятий на кафедре биохимии и биофизики Дагестанского государственного университета и включены в спецкурс «Свободнорадикальные процессы в биологических системах».

**Апробация материалов диссертации.** Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на Международной научной конференции «Молекулярные механизмы адаптации» (г. Махачкала, 2008), II Международной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины» (г. Ростов-на-Дону, 2008), 12-й, 13-й, 14-й Международных школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2008, 2009, 2010), II, III и IV Всероссийских научно-практических конференциях «Научная инициатива иностранных студентов и аспирантов российских вузов» (г. Томск, 2009, 2010, 2011), Всероссийской конференции «Закономерности распространения, воспроизведения и адаптаций растений и животных» (г. Махачкала, 2010). 7 Междунар. междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, 2011).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 131 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения полученных данных, заключения и выводов. Работа содержит 6 таблиц и 15 рисунков. Список литературы включает 248 источников.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на 126 белых крысах-самцах Вистар, массой 200-230 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. В эксперименте воспроизводились неполная ишемия головного мозга и механизм его реперфузионного повреждения. Ишемия головного мозга осуществлялась полной перевязкой обеих сонных артерий в течение 30, 60, 90 мин. Для создания реперфузионной модели ишемического повреждения у части животных после 60 минутной окклюзии двух сонных артерий моделировали реперфузию путем снятия лигатуры. Продолжительность реперфузии составила 60 и 90 мин. В качестве контроля использовали ложнооперированные животные. Все хирургические процедуры проводили под наркозом (внутрибрюшное введение тиопентала натрия в дозе 40-50 мг/кг). В период ишемии и

реперфузии температура тела животного поддерживали на нормальном уровне (37°C). За 30 мин до декапитации (контроль) или за 30 мин до начала ишемии крысам внутрибрюшинно вводили 0,5 мл фармакопейного препарата даларгина (НПО «Микроген») в дозе 0,1 или 0,5 мг/кг массы. Интактным животным вводили такой же объём физиологического раствора. Дозы и сроки инъекции даларгина выбраны на основе анализа данных литературы по проявлению целого ряда биохимических и физиологических эффектов пептида (Лишманов, Маслов, 1994). В части опытов непосредственно перед окклюзией сонных артерий температура тела животного снижали до 33-34°C. Гипотермию вызывали, обкладывая тело животного целлофановым пакетом с мелкоколотым льдом. Температуру тела измеряли ректальным цифровым термометром MS6501.

Из коры головного мозга синапсосомы выделяли методом низкоскоростного центрифугирования (Hajos, 1975), с использованием центрифуги MR23i (Германия), а мембраны синапсосом – после гипоосмотического шока (Захарова, Аврова, 1998). Все процедуры проводили при 2-4°C.

Активность Na, K-АТФазы в мембранах синапсосом определили по скорости накопления в среде инкубации неорганического фосфора (Рожанец и др., 1978) в ходе гидролиза АТФ и рассчитывали как разность между общей и Mg<sup>2+</sup>-зависимой АТФазной активностью. Среда для определения общей АТФазы содержала следующие компоненты (в ммоль/л): NaCl – 130, KCl – 20, MgCl<sub>2</sub> – 3, АТФ – 3, трис-HCl буфер (pH 7,4) – 30 и 50 мкг белка. При определении активности Mg<sup>2+</sup>-АТФазы в среду инкубации кроме указанных компонентов вносили еще ингибитор Na, K-АТФазы убаин в конечной концентрации 1 мМ. Активность АХЭ мембран синапсосом определяли по методу Элмана (Ellman et al., 1961), используя в качестве субстрата ацетилтиохоллин (0,5 ммоль).

О свободнорадикальных процессах (СРП) в синапсосомах мозга судили по интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), окислительной модификации белков, содержания восстановленного глутатиона, активности ключевых антиокислительных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. При этом в суспензии синапсосом определяли содержание малонового диальдегида (МДА) (Лысакова и др., 1997), карбонильных групп мембранных белков (Venditti et al., 2004), глутатиона (Арутюнян и др., 2000), активность СОД (Fried, 1975) и каталазы (Королюк и др., 1988). Содержание белка определяли по Лоури (Lowry et al., 1951).

Статистическую обработку результатов исследования проводили по t-критерию Стьюдента, используя пакет прикладных программ «Excel» и «Statistica» для Windows.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### **Влияние даларгина и гипотермии на активность Na, K-АТФазы синапсосом мозга при ишемии и реперфузии**

Проведенные нами исследования показали, что при ишемии активность Na, K-АТФазы мембран синапсом снижается (табл. 1). К 30 мин ишемии активность фермента снизилась на 32,1%, к 60 мин – на 45,8%, а к 90 мин – на 53,7% относительно контроля. Таким образом, степень ингибирования фермента зависит от длительности ишемии.

Таблица 1  
Активность Na, K-АТФазы мембран синапсом коры головного мозга крыс при ишемии и последующей реперфузии ( $M \pm m$ ;  $n = 4-6$ )

Условия эксперимента	Продолжительность ишемии и реперфузии, мин	Активность Na, K-АТФазы, мкмоль $P_n$ /мг/ч
Контроль	-	35,23±1,28
Ишемия	30	23,93±0,46 $P < 0,001$
	60	19,09±0,73 $P < 0,001$
	90	16,31±1,12 $P < 0,001$
Реперфузия после 60 мин ишемии	60	27,86±0,62 $P < 0,001$ $P_1 < 0,001$
	90	30,53±1,04 $P < 0,002$ $P_1 < 0,001$

$P$  – достоверное различие относительно контроля;  $P_1$  – относительно ишемии 60 мин.

Исследование фермента в постишемическом периоде показало, что снятие лигатуры и восстановление кровоснабжения мозга после 60 мин ишемии приводит к повышению активности Na, K-АТФазы (табл. 1). Через 60 мин реперфузии активность фермента возрастает на 45,9%, а после 90 мин – на 59,9% относительно ишемии. Таким образом, при ишемии/реперфузии происходит обратимое ингибирование Na, K- АТФазы.

Для установления участия опиоидной системы в регуляции активности Na, K-АТФазы мембран синапсом при ишемии, животным перед окклюзией сонных артерий вводили даларгин. Выяснилось, что пептид в дозе 0, 1 мг/кг не оказывает влияние на активность Na, K-АТФазы после 60 мин ишемии (рис. 1). Это означает, что стимуляция только периферических опиоидных рецепторов не влияет на активность Na, K-АТФазы мембран синапсом при ишемии мозга. Увеличение введенной дозы даларгина до 0, 5 мг/кг способствовало повышению активности фермента при ишемии. При этом активность Na, K-АТФазы после 60 мин ишемии на 25% выше, чем при ишемии без введения пептида. Через 60 и 90 мин реперфузии активность Na, K-АТФазы мембран синапсом на фоне введения даларгина в дозе 0, 5 мг/кг



выше на 8,7% и 11,2% соответственно, чем без введения пептида.

Таким образом, даларгин, в дозе, проникающей в головной мозг, защищает Na, K-АТФазу синаптических мембран от повреждения как в период ишемии, так и реперфузии. Следует отметить, что защитный эффект даларгина в отношении Na, K-АТФазы в период ишемии выше, чем в постишемический период.

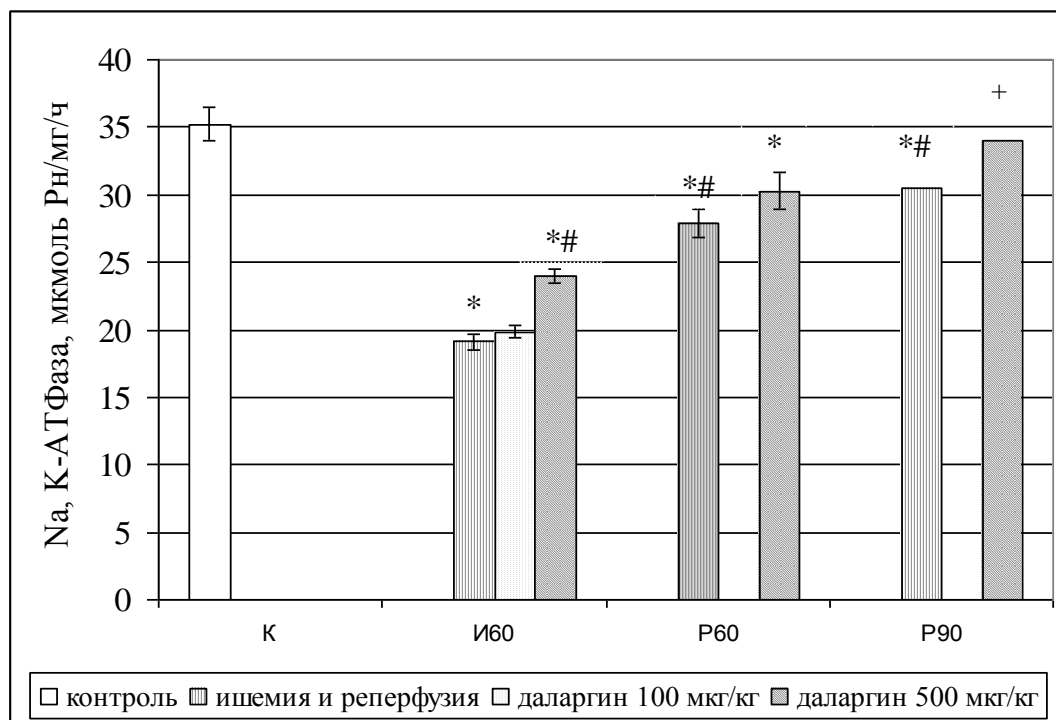


Рис. 1. Влияние даларгина на активность Na, K-АТФазы мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии/реперфузии. К – контроль; И60 – ишемия 60 мин; P60 и P90 – реперфузия 60 или 90 мин после ишемии 60 мин. \* –  $p < 0,05$  относительно К; # –  $p < 0,05$  относительно И60; + –  $p < 0,05$  относительно P90.

В последнее время увеличиваются свидетельства того, что использование искусственной гипотермии оказывает нейропротекторный эффект при неврологических повреждениях. В связи с нейропротекторным эффектом легкой и умеренной гипотермии мы в дальнейшем исследовали активность Na, K-АТФазы мембран синапсом при ишемии, воспроизведенной на фоне легкой гипотермии. Выяснилось, что снижение температуры тела контрольных (ложнооперированных) крыс до 33-34°C приводит к падению активности Na, K-АТФазы на 13,1% относительно контроля (рис. 2). В отличие от контроля гипотермия во время ишемии защищает Na, K-АТФазу от ишемического повреждения. Об этом свидетельствует тот факт, что при ишемии на фоне гипотермии активность фермента существенно выше, чем при ишемии без гипотермии. Так, активность Na, K-АТФазы относительно контроля при ишемии снижается на 45,8%, а при ишемии на фоне гипотермии – только на 22,4%.

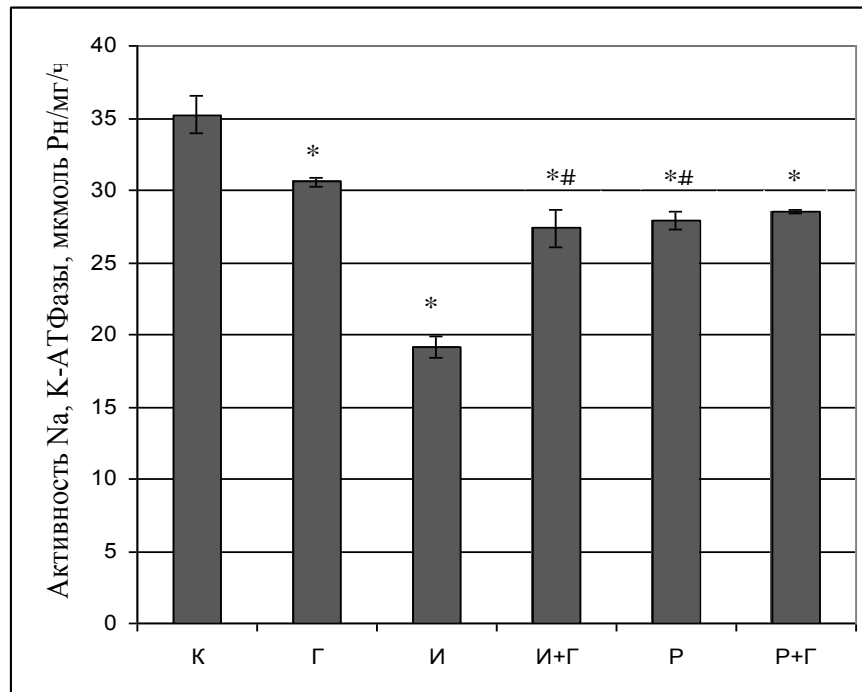


Рис. 2. Влияние гипотермии 33-34°C на активность Na, К-АТФазы мембран синапсом коры головного мозга крыс при ишемии/реперфузии. К – контроль; Г – гипотермия; И – ишемия 60 мин; И+Г – ишемия 60 мин на фоне гипотермии; Р – реперфузия 60 мин после ишемии 60 мин; Р+Г – реперфузия 60 мин после ишемии 60 мин на фоне гипотермии. \* –  $p < 0,05$  относительно К; # –  $p < 0,05$  относительно И.

Следует отметить, что в отличие от периода ишемии, снижение температуры тела только в период реперфузии не приводит к защите Na, К-АТФазы нейронов от ингибирования (рис. 2).

### **Влияние даларгина и гипотермии на активность ацетилхолинэстеразы мембран синапсом мозга крыс при шемии и реперфузии**

Проведенные нами исследования показали, что при ишемии активность АХЭ снижается (табл. 2). Причем степень торможения активности АХЭ зависит от длительности окклюзии сонных артерий. Через 30 мин ишемии активность АХЭ снижается на 20,5%, через 60 мин – на 28,3%, через 90 мин – на 39,7% относительно контроля.

Реперфузия мозга после 60 мин его ишемии сопровождается достоверным повышением активности АХЭ относительно значений в ишемизированном мозге без реперфузии (табл. 2). Активность фермента через 60 мин реперфузии возрастает на 14%, а через 90 мин – на 22,4% по сравнению с его активностью при ишемии. Однако активность АХЭ через 90 мин реперфузии не достигает контрольного уровня.

Таблица 2

Активность ацетилхолинэстеразы мембран синапсом мозга крыс при ишемии и реперфузии ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Условия эксперимента	Продолжительность ишемии и реперфузии, мин	Активность АХЭ, мкмоль/мг/ч
Контроль	-	46,68±0,67
Ишемия	30	37,10±0,59 P< 0,001
	60	33,45±1,20 P< 0,001
	90	28,14±0,86 P< 0,001
Реперфузия после 60 мин ишемии	60	38,14±0,53 P< 0,001 P <sub>1</sub> <0,05
	90	40,95±0,47 P< 0,001 P <sub>1</sub> <0,001

Примечание: P – достоверные различия относительно контроля, P<sub>1</sub> – относительно ишемии 60 мин.

Данные по изучению защитного действия даларгина при ишемии приведены на рис. 3.

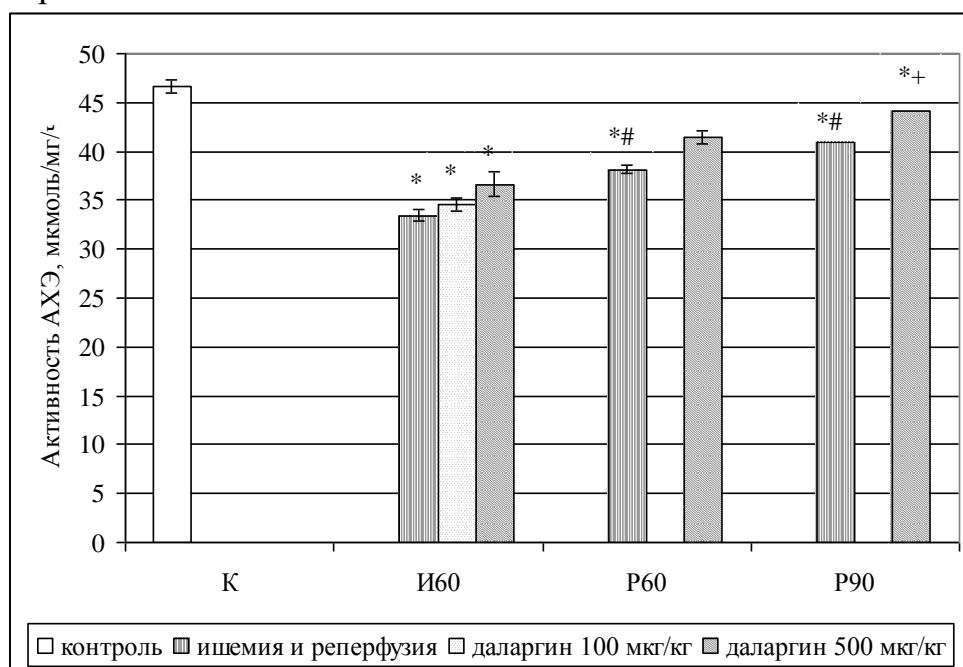


Рис. 3. Влияние даларгина на активность АХЭ мембран синапсом головного мозга при ишемии и реперфузии. К – контроль; И60 – ишемия 60 мин; P60 и P90 – реперфузия мозга в течение 60 и 90 мин после ишемии 60 мин. \* –  $p < 0,05$  относительно К; # –  $p < 0,05$  относительно И60; + –  $p < 0,05$  относительно реперфузии без введения пептида.

Введение даларгина в дозе 0, 1 мг/кг за 30 мин до ишемии не оказало влияние на активность АХЭ мембран синапсом после 60 мин ишемии как и в случае Na, К-АТФазы (рис. 1). В дозе 0, 5 мг/кг активность фермента после 60 мин ишемии на 9,6% выше, чем при ишемии без введения пептида. В период реперфузии активность АХЭ на фоне даларгина выше по сравнению с реперфузией без введения пептида. Рост активности АХЭ при этом составляет через 60 мин реперфузии 8,5%, а через 90 мин реперфузии – 7,8% ( $p < 0.01$ ).

Таким образом, даларгин, в дозе, проникающей в головной мозг, частично защищает АХЭ синаптических мембран от ишемического повреждения.

В следующей серии экспериментов мы исследовали влияние гипотермии на активность АХЭ синаптических мембран мозга крыс при ишемии и реперфузии (рис. 4). Как видно, мягкая гипотермия существенно не влияет на активность АХЭ у контрольных животных.

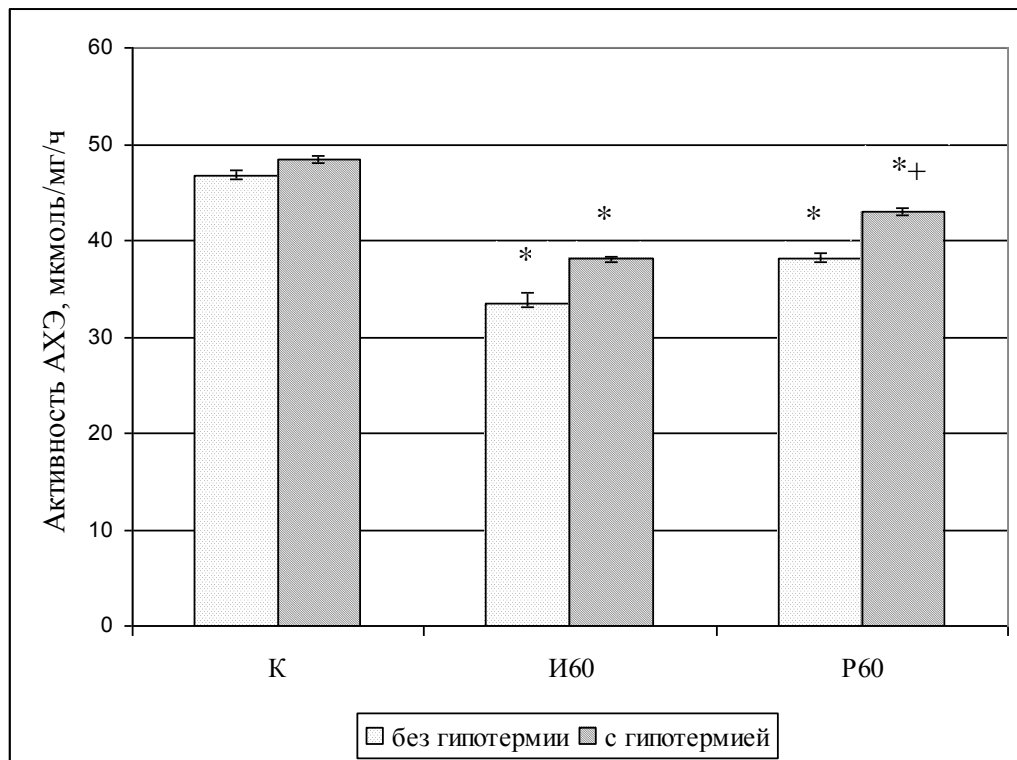


Рис. 4. Влияние гипотермии 33-34°C на активность АХЭ мембран синапсом коры головного мозга крыс при ишемии/реперфузии. К – контроль; И – ишемия 60 мин; Р – реперфузия 60 мин после ишемии 60 мин; \* –  $p < 0,05$  относительно нормотермического контроля; # –  $p < 0,05$  относительно ишемии и реперфузии без гипотермии.

При ишемии на фоне гипотермии активность фермента существенно выше, чем при ишемии без гипотермии (рис. 4). Так, активность АХЭ относительно контроля при ишемии снижается на 28,3%, а при ишемии на фоне гипотермии – только на 18,5%. Таким образом, гипотермия во время ишемии защищает АХЭ от ишемического повреждения. Снижение температуры тела

только в период реперфузии также оказывает защитный эффект на фермент. Так, активность АХЭ после реперфузии снижена на 18,3%, а после реперфузии на фоне гипотермии – на 8% относительно контроля (рис. 4).

Таким образом, снижение температуры тела до 33-34°C в период ишемии или после восстановления кровоснабжения мозга частично предотвращает ингибирование АХЭ мембран синапсом.

Корреляционный анализ показал, что между изменением активности Na, К-АТФазы и АХЭ синаптических мембран при ишемии/реперфузии имеется достоверная в высокой степени положительная связь ( $r = 1,00$ ;  $p < 0,05$ ). Это означает, что ингибирование исследуемых ферментов при ишемии происходит вследствие воздействия на них одних и тех же факторов. Возможно, что это является следствием их окислительной модификации под действием АФК. В связи с этим в дальнейшем мы исследовали интенсивность СРП в синапсосах при ишемии/реперфузии.

### **Влияние даларгина и гипотермии на свободнорадикальные процессы в синапсосах мозга при ишемии и реперфузии**

Интенсивность ПОЛ в суспензии синапсом оценивали по содержанию МДА. При этом измерено исходное содержание МДА и его накопление в суспензии синапсом за 15 минут в присутствии системы  $Fe^{2+}$ -аскорбат. Первый показатель характеризует стационарное содержание МДА *in vivo*, а второй показатель зависит как от содержания гидроперекисей липидов (предшественника МДА), так и от доступности двойных связей жирнокислотных остатков липидов свободным радикалам, генерируемым системой  $Fe^{2+}$ -аскорбат.

Таблица 3

Содержание МДА и скорость его накопления в присутствии прооксидантов в синапсосах из коры головного мозга крыс при ишемии и реперфузии ( $M \pm m$ ;  $n=4-6$ )

Состояние животного	МДА (нмоль/мг белка)	
	исходный уровень	прирост за 15 мин в присутствии $Fe^{2+}$ -аскорбат
Контроль	$3,04 \pm 0,09$	$8,47 \pm 0,24$
Ишемия 60 мин	$3,66 \pm 0,23$ $P < 0,05$	$10,46 \pm 0,65$ $P < 0,05$
Ишемия 60 мин+ реперфузия 60 мин	$2,96 \pm 0,18$ $P_1 < 0,05$	$15,11 \pm 0,58$ $P < 0,01$ $P_1 < 0,001$

Примечание: P – достоверные различия относительно контроля,  $P_1$  – относительно ишемии 60 мин.

Окклюзия сонных артерий в течение 60 мин приводит к повышению исходного содержания МДА в суспензии синаптосом на 20% относительно контроля (табл. 3). Аскорбат-индуцированный уровень МДА при ишемии также возрастает на 20%. В период реперфузии исходное содержание МДА в суспензии синаптосом снижается до контрольного уровня. Однако аскорбат-индуцированный уровень МДА при реперфузии возрастает на 78% относительно контроля. Это означает, что в период реперфузии мембранные липиды синаптосом становятся более доступными для радикалов кислорода, генерируемых *in vitro*. Независимо от интерпретации полученных результатов твёрдо установлено, что при ишемических состояниях в синаптических мембранах происходит существенное изменение содержания интермедиатов СРП в липидной матрице.

Помимо липидов АФК участвуют в окислительной модификации белков нейрональных мембран. Белки в силу особенностей своего строения являются одними из основных мишеней АФК (Дубинина, Пустыгина, 2008; Муравлева и др., 2010). Поскольку окислительная модификация белков носит избирательный и специфический характер, а ее продукты являются маркерами раннего оксидативного стресса, то исследование этого процесса при ишемии/реперфузии представляет определенный интерес.

Как видно из табл. 4, ишемия приводит к резкому увеличению (на 100%) исходного уровня карбониллов в мембранных белках. В период реперфузии исходное содержание карбонильных групп в белках мембран синаптосом снижается относительно состояния ишемии, но остается выше контрольного уровня на 49%.

Таблица 4

Содержание карбонильных групп (нмоль/мг белка) и скорость их накопления в присутствии прооксидантов в белках мембран синаптосом из коры головного мозга крыс при ишемии и реперфузии ( $M \pm m$ ;  $n=4-6$ )

Состояние животного	Карбонильные группы	
	исходный уровень	прирост за 15 мин в присутствии $Fe^{2+}$ - $H_2O_2$
Контроль	$2,57 \pm 0,12$	$13,27 \pm 0,35$
Ишемия 60 мин	$5,14 \pm 0,35$ $P < 0,05$	$16,32 \pm 1,23$ $P < 0,05$
Ишемия 60 мин+реперфузия 60 мин	$3,83 \pm 0,01$ $P < 0,01$ $P_1 < 0,01$	$13,75 \pm 0,73$

Примечание: P – достоверные различия относительно контроля,  $P_1$  – относительно ишемии 60 мин.

Ишемия приводит также к накоплению карбониллов (на 23%) в присутствии системы Фентона, генерирующей ОН-радикалы. Реперфузия приводит к уменьшению накопления карбониллов в белках мембран, что, возможно, обусловлено тем, что число мишеней для ОН-радикалов снижено вследствие их окисления *in vivo*.

Интенсивность окислительной модификации мембранных липидов и белков при ишемии/реперфузии может быть связана не только от скорости генерации АФК, но и от активности антиоксидантной защиты синаптических окончаний нейронов. В связи с этим было изучено изменение активности антиоксидантной защиты синапсом при ишемии мозга и в ближайшем постшемическом периоде.

Анализ содержания основного клеточного антиоксиданта – восстановленного глутатиона показал, что ишемия существенно снижает (на 50%) его уровень в синапсомах (табл. 5). Реперфузия приводит к дальнейшему снижению содержания глутатиона в синапсомах. Снижение уровня глутатиона коррелирует ( $r = 0,88$ ) со снижением активности мембранных ферментов (Na, K-АТФазы и АХЭ) и степенью окислительной модификации мембранных липидов и белков синапсом при ишемии.

Таблица 5

Содержание глутатиона (ммоль/мг белка), активность СОД (усл. ед/мг белка) и каталазы (мкмоль  $H_2O_2$ /мг белка/мин) в синапсомах из коры головного мозга крыс при ишемии и реперфузии ( $M \pm m$ ;  $n=4-6$ )

Состояние животного	Содержание глутатиона	Активность СОД	Активность каталазы
Контроль	0,975 ± 0,007	182,8 ± 0,1	3,88 ± 0,15
Ишемия 60 мин	0,491 ± 0,024 P<0,001	107,2 ± 0,5 P< 0,001	2,92 ± 0,04 P<0,05
Ишемия 60 мин +реперфузия 60 мин	0,362 ± 0,025 P<0,001 P <sub>1</sub> <0,05	65,1 ± 0,8 P<0,001 P <sub>1</sub> < 0,001	1,19 ± 0,02 P<0,001 P <sub>1</sub> < 0,001

Примечание: P – достоверные различия относительно контроля, P<sub>1</sub> – относительно ишемии 60 мин.

Ключевым ферментом антиокислительной защиты является СОД, так как при ее участии прерывается цепь СРП в начале своего зарождения на стадии одноэлектронного восстановления кислорода с образованием  $O_2^{\cdot -}$  (Fridovich, 1997). Ишемия снижает активность СОД на 41% относительно контроля (табл. 5). При реперфузии происходит дальнейшее снижение активности фермента. Степень ингибирования СОД при этом составляет 60% относительно контроля.

СОД катализирует реакцию диспропорционирования двух молекул  $O_2^-$  с образованием одной молекулы  $O_2$  и одной молекулы  $H_2O_2$ . Одним из главных регуляторов концентрации  $H_2O_2$  в клетках со стороны антиоксидантной системы является каталаза. Считается, что для надежной антиоксидантной защиты соотношение активностей СОД и пероксидаз, в частности, каталазы и глутатионпероксидазы должно быть сбалансировано.

Исследование каталазы показало, что при ишемии активность фермента в синапсосомах снижается, но в меньшей степени (на 25%), чем активность СОД (табл. 5). Однако при реперфузии активность каталазы, как и активность СОД, снижается примерно на 60% относительно контроля.

Исходя из полученных данных можно предположить, что снижение активности антиоксидантной защиты синапсосом является фактором способствующим ингибированию Na, К-АТФазы и АХЭ и повреждению нейронов при ишемии и реперфузии.

В следующей серии экспериментов было исследовано влияние даларгина на интенсивность СРП в мозге. Выяснилось, что даларгин полностью предотвращает повышение исходного уровня МДА в синапсосомах при ишемии (рис. 5). При этом пептид уменьшает также аскорбат-индуцированное накопление МДА в суспензии синапсосом.

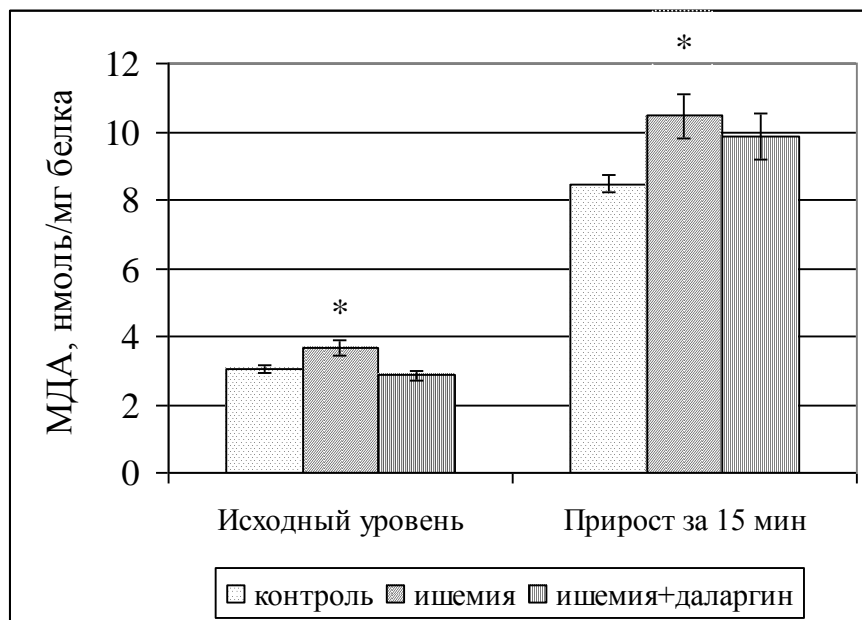


Рис. 5. Влияние даларгина (0,5 мг/кг) на содержание МДА и его накопление в присутствии прооксидантов в синапсосомах из коры головного мозга крыс при ишемии 60 мин. \* –  $p < 0,05$  относительно контроля.

Даларгин влияет и на содержание карбонильных групп в белках мембран синапсосом при ишемии (рис. 6). Предварительное введение даларгина полностью предотвращает повышение исходного уровня карбонильных групп в мембранных белках при ишемии. При ишемии на фоне даларгина в



суспензии мембран синапсом меньше образуются карбонилы в присутствии ОН-радикалов по сравнению с ишемией без введения пептида.

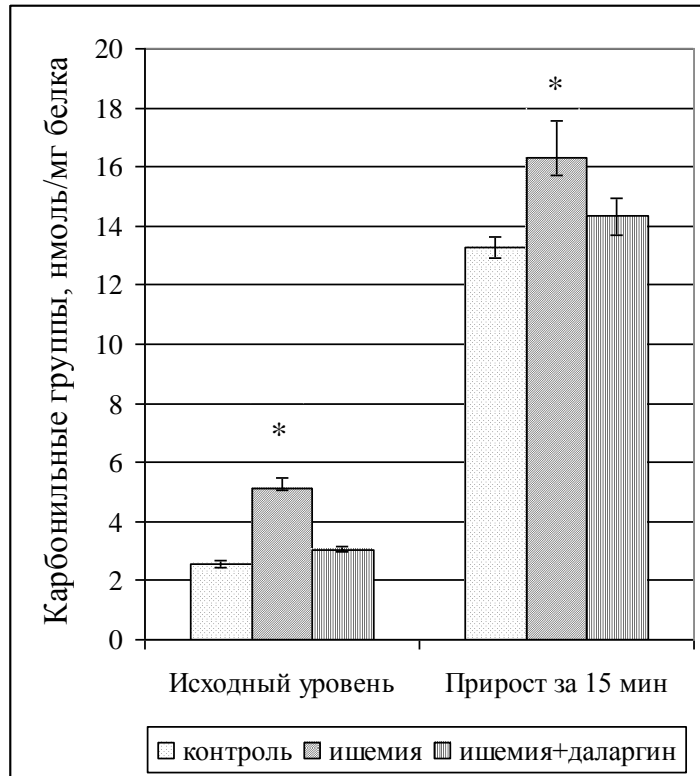


Рис. 6. Влияние даларгина (0,5 мг/кг) на содержание карбонильных групп и их накопление в присутствии прооксидантов в белках мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии 60 мин; \* –  $p < 0,05$  относительно ишемии.

Таким образом, однократное внутрибрюшинное введение аналога опиоидных пептидов даларгина предупреждает повышение уровня ПОЛ и окислительной модификации белков мембран синапсом при ишемии.

Исследование влияния даларгина на активность антиоксидантной защиты синапсом показало, что опиоидный пептид предотвращает падение уровня глутатиона в синапсомах при ишемии: содержание глутатиона в синапсомах при ишемии составляет  $0,491 \pm 0,024$  ммоль/мг, а при ишемии на фоне введения даларгина –  $0,845 \pm 0,025$  ммоль/мг (контроль –  $0,975 \pm 0,007$  ммоль/мг).

При ишемии даларгин не только предотвращает ингибирование СОД и каталазы в синапсомах, но существенно активируют их (рис. 7). При ишемии на фоне даларгина активность СОД повышается на 38%, каталазы – на 113% относительно контроля.

Эти результаты свидетельствуют о том, что защита мембранных липидов и белков от окислительной модификации при ишемии на фоне даларгина связана с активацией пептидом антиоксидантной системы синапсом.

Таким образом, введение даларгина предотвращает развитие окислительного стресса в синаптических окончаниях нервных клеток при ишемии.

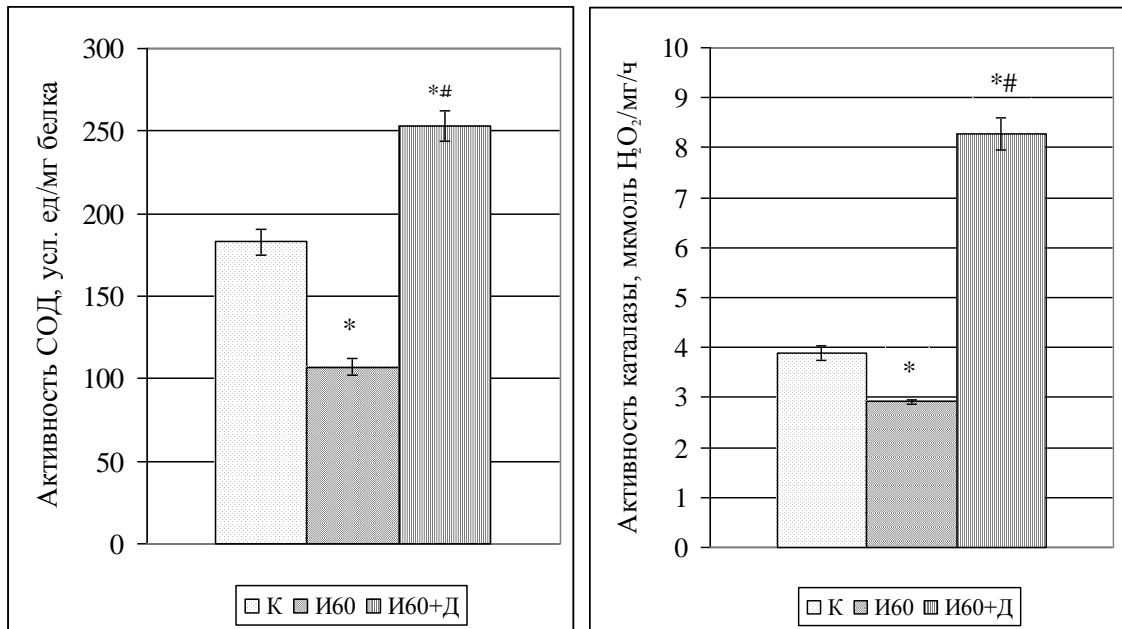


Рис. 7. Влияние даларгина (0,5 мг/кг) на активность СОД и каталазы в синап- тосомах из коры головного мозга крыс при ишемии. К – контроль; И – ише- мия 60 мин; И60+Д – введение даларгина и последующая ишемия 60 мин; \* –  $p < 0,05$  относительно контроля; # –  $p < 0,05$  относительно ишемии.

Исследование влияния гипотермии на процессы ПОЛ показало, что мяг- кая гипотермия, вызванная во время ишемии, снижает исходный уровень МДА в синап- тосомах на 17% относительно контроля (рис. 8). Однако при ишемии на фоне гипотермии увеличивается аскорбат-индуцированное нако- пление МДА в суспензии синапсом.

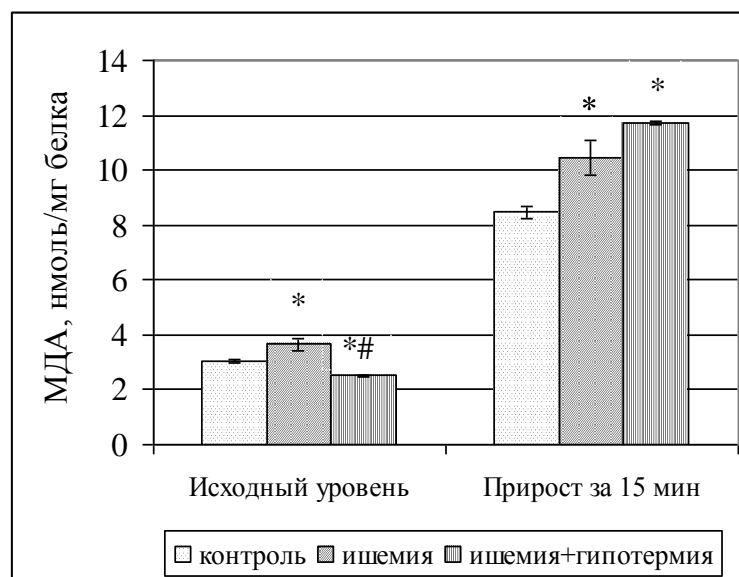


Рис. 8. Влияние гипотермии на содержание МДА и его накопление в присут- ствии прооксидантов в синап- тосомах из коры головного мозга крыс при ишемии 60 мин. \* –  $p < 0,05$  относительно контроля. # –  $p < 0,05$  относительно ишемии.

Гипотермия 33-34°C, вызванная во время ишемии, также снижает исходный уровень карбонильных групп в белках синапсом на 16% относительно их содержания при ишемии (рис. 9). Однако при ишемии на фоне гипотермии в инкубируемых *in vitro* пробах суспензии мембран синапсом карбонилы образуются в таком же количестве, как и при ишемии.

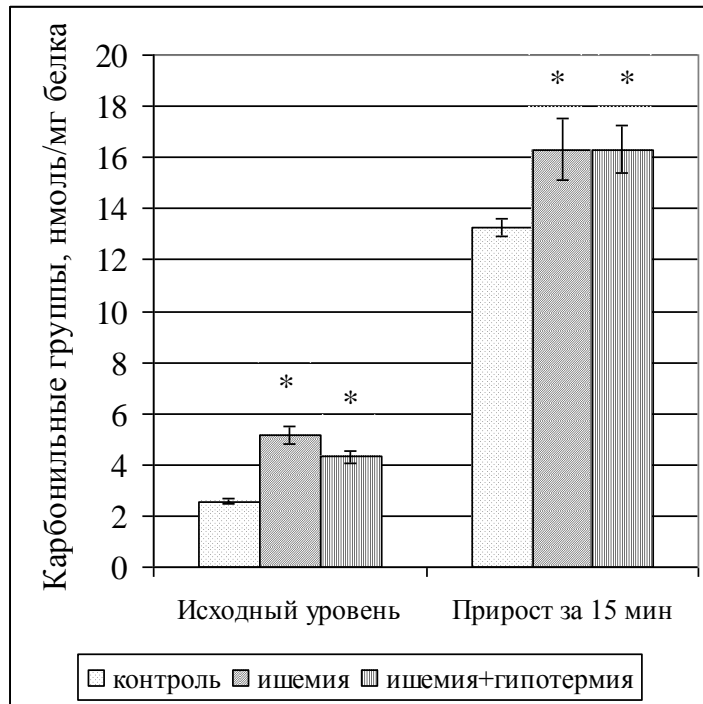


Рис. 9. Влияние гипотермии на содержание карбонильных групп и их накопление в присутствии прооксидантов в белках мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии 60 мин; \* –  $p < 0,05$  относительно контроля.

Таким образом, гипотермия при ишемии снижает интенсивность окислительной модификации как липидов, так и белков мембран синапсом. Причем, липидов в большей степени, чем белков. Прямой вывод из этих фактов состоит в том, что гипотермия снижает интенсивность СРП в пресинаптическом компартменте. Однако при гипотермии уровень индуцируемого накопления МДА и карбониллов в суспензии синапсом возрастает при ишемии. Этот показатель отражает происходящее не *in vivo*, а *in vitro*, т.е. свойства синапсом, извлечённых из ишемического нормотермического и гипотермического мозга. Почему гипотермия не препятствует увеличению уровня накопления МДА и карбониллов в мембранах синапсом при ишемии? Либо потому, что при ишемии на фоне гипотермии содержание субстратов окисления увеличиваются *in vivo*, либо потому, что они обладают большей реакционной способностью (более доступны).

Снижение интенсивности СРП в синапсомах при ишемии на фоне гипотермии однако не связано с активацией антиоксидантной защиты. Наоборот, снижение температуры тела животных при ишемии приводит к гораздо большему падению уровня восстановленного глутатиона в синапсо-

мах, чем при ишемии. Так, содержание глутатиона в синапсосамах при ишемии составляет  $0,491 \pm 0,024$  ммоль/мг, а при ишемии на фоне гипотермии –  $0,350 \pm 0,025$  ммоль/мг (контроль –  $0,975 \pm 0,007$  ммоль/мг).

Гипотермия при ишемии также существенно снижает активность СОД и каталазы синапсосом (рис. 10). При ишемии на фоне гипотермии активность СОД снижается на 61,7%, каталазы – на 60,1% относительно контроля.

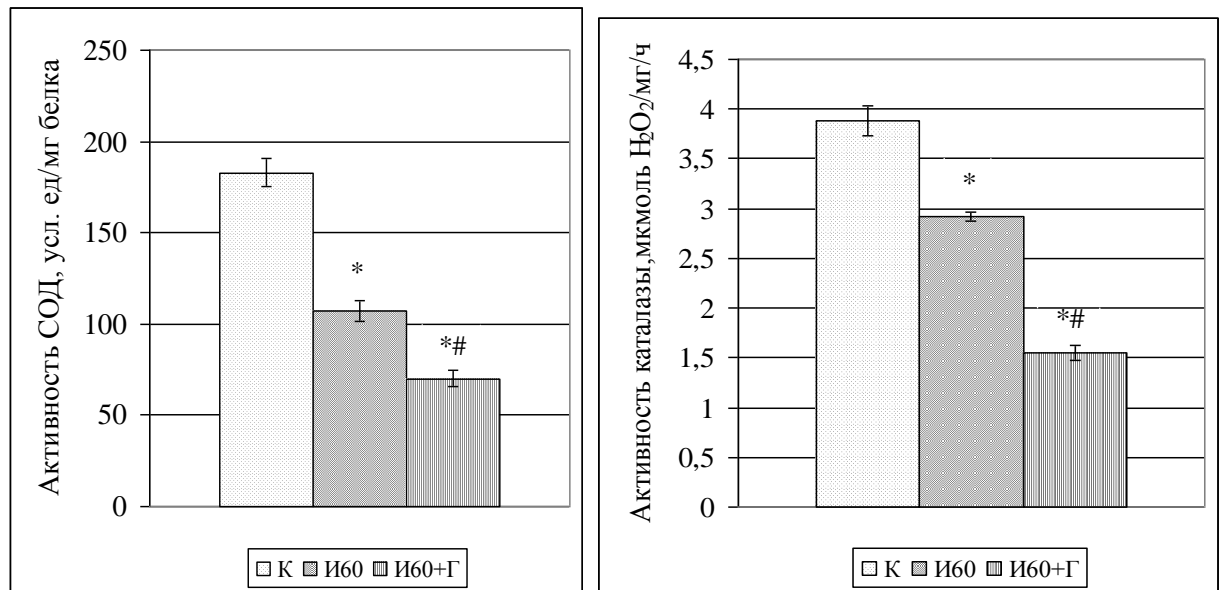


Рис. 10. Влияние гипотермии на активность СОД и каталазы в синапсосамах из коры головного мозга крыс при ишемии. К – контроль; И60 – ишемия 60 мин; И60+Г – ишемия 60 мин на фоне гипотермии; \* –  $p < 0,05$  относительно контроля; # –  $p < 0,05$  относительно ишемии.

Таким образом, снижение температуры тела крыс во время ишемии приводит к существенному подавлению антиоксидантной защиты синапсосом. Поскольку при ишемии на фоне гипотермии исходные уровни продуктов окислительной модификации мембранных липидов и белков синапсосом снижаются, то можно предположить, что защитный эффект гипотермии заключается в снижении генерации АФК.

## ВЫВОДЫ

1. При окклюзии сонных артерий имеет место ингибирование Na, К-АТФазы и АХЭ мембран синапсосом, выраженность которого прямо связана с длительностью ишемии. При этом степень ингибирования Na, К-АТФазы выше, чем АХЭ. В период реперфузии активность Na, К-АТФазы и АХЭ мембран синапсосом возрастает относительно уровня их активности при ишемии.

2. Опиоидный нейропептид даларгин в дозе, проникающей в головной мозг, предотвращает ингибирование Na, К-АТФазы и АХЭ синаптических мембран как в период ишемии, так и реперфузии.

3. Мягкая гипотермия во время ишемии, а не в период реперфузии, защищает Na, K-АТФазу и АХЭ мембран синапсом от ишемического повреждения.

4. Через 1 ч после окклюзии сонных артерий имеет место возрастание степени окислительной модификации липидов и белков мембран синапсом при одновременном снижении активности антиоксидантной защиты. В период реперфузии снижается степень окислительной модификации липидов и белков мембран синапсом относительно уровня при ишемии на фоне дальнейшего снижения активности антиоксидантной защиты.

5. Предварительное введение даларгина при ишемии полностью предотвращает окислительную модификацию липидов и белков мембран синапсом, а также активирует антиокислительную защиту.

6. Мягкая гипотермия, вызванная во время ишемии, полностью предотвращает окислительную модификацию мембранных липидов и лишь частично белков. Гипотермия при ишемии не предотвращает повышения доступности мембранных липидов и белков оксидантам, а также существенно подавляет активность антиокислительной защиты синапсом.

## СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Список работ, опубликованных в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Мохаммед М.Т., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на активность ацетилхолинэстеразы мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии и реперфузии // Изв. Дагестанского гос. педагогического ун-та. Естеств. и точные науки. – 2010. – №2. – 69-73.

2. Мохаммед М.Т., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на активность Na, K-АТФазы мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии и реперфузии // Изв. Самарского науч. центра РАН. – 2011. – Т. 13. – № 1. – С. 260-263.

3. Мохаммед М.Т., Кличханов Н. К. Свободнорадикальные процессы в синапсоммах из коры головного мозга крыс при окклюзии сонных артерий // Вестн. Дагестанского ГУ. Естественные науки. – 2011. – №1. – С. 124-128.

### Статьи, опубликованные в других журналах, а также в сборниках научных трудов, конференций, симпозиумов и конгрессов

4. Кадималиева З.Ф., Мохаммед М. Т., Кличханов Н.К. Механизмы повреждения головного мозга при ишемии // Вестник ДГУ. Естеств. науки. – 2008, вып.6. – С. 60-66.

5. Кадималиева З.Ф., Мохаммед М. Т., Кличханов Н.К. Роль гипотермии в защите мозга при ишемическом инсульте // Сб. трудов Междун. конф. «Молекулярные механизмы адаптации», Махачкала. – 2008. – С.35-37.

6. Мустафа Таха Мохаммед. Влияние даларгина на активность Na, K-АТФазы мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии и

реперфузии // Труды молодых ученых ДГУ. Махачкала. – 2009. – С.104-105.

7. Мустафа Таха Мохаммед. Механизмы ишемического повреждения головного мозга // Сборник докл. II Всероссийской научно-практической конф. «Научная инициатива иностранных студентов и аспирантов российских вузов». Томск. – 2009. – С.281-289.

8. Мохаммед М.Т., Аль-Саеди С. М. К., Кличханов Н.К. Влияние гипотермии на активность Na, K-АТФазы мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии // Закономерности распространения воспроизведение и адаптаций растений и животных. Махачкала. – 2010. – С. 296-298.

9. Мохаммед М.Т., Аль-Саеди С. М. К., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на активность Na, K-АТФазы и ацетилхолинэстеразы мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии // Сборник докл. III Всероссийской научно-практической конф. «Научная инициатива иностранных студентов и аспирантов российских вузов». Томск. – 2010. – С.306-307.

10. Мохаммед М.Т. Влияние гипотермии на свободнорадикальные процессы в мозге крыс при окклюзии сонных артерий // Сборник докл. IV Всероссийской научно-практической конф. «Научная инициатива иностранных студентов и аспирантов российских вузов». Томск. – 2011. – С. 353.

### Тезисы

11. Мохаммед М.Т., Кличханов Н.К. Влияние ишемии на активность Na,K-АТФазы и ацетилхолинэстеразы мембран синапсом из коры головного мозга крыс // Мат. II Междун. конф «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». Ростов-на-Дону. – 2008. – С. 34-35.

12. Исмаилова Ж.Г., Астаева М.Д., Мохаммед М.Т., Кличханов Н.К. Интенсивность перекисного окисления липидов мозга крыс в ходе самосогревания после перенесенной глубокой гипотермии // Сб. тез. 12-ой Международ. Пуцинской школы-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино. – 2008. – С.88.

13. Мохаммед М.Т., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на активность Na, K-АТФазы мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии и реперфузии // Сб. тез. 13-ой Международ. Пуцинской школы-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века» Пушино. – 2009. – С. 76.

14. Мохаммед М.Т., Аль-Саеди С.М.К., Шихамирова З.М., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на активность Na, K-АТФазы и ацетилхолинэстеразы мембран синапсом из коры головного мозга крыс при ишемии // Сб. тез. 14-ой Международ. Пуцинской школы-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века» Пушино. – 2010. – С. 47.

15. Кличханов Н.К., Мохаммед М.Т., Исмаилова Ж.Г. Влияние гипотермии на свободнорадикальные процессы в мозге крыс при окклюзии сонных артерий // Труды 7-го Международ. междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым) – М.: МАКС Пресс, 2011. – С. 218-219.

## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

АХЭ – ацетилхолинэстераза

МДА – малоновый диальдегид

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД – супероксиддисмутаза

СРП – свободнорадикальные процессы