

ОТСРОЧЕННАЯ РЕАКЦИЯ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРОМЕДИАТОРНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ОСТРОЙ МАССИВНОЙ КРОВОПОТЕРЕ

В. Л. Кожура¹, В. В. Малыгин*, Г. Ф. Махаева*,
О. Г. Серебрякова*, И. С. Новодержкина, А. К. Кирсанова

ГУ НИИ общей реаниматологии РАМН, Москва

* Институт физиологически активных веществ РАН, Московская область, Черноголовка

A Late Response of the Cholinergic Neurotransmitter System in Acute Massive Blood Loss

V. L. Kozhura¹, V. V. Malygin*, G. F. Makhayeva*,
O. G. Serebryakova*, I. S. Novoderzhkina, A. K. Kirsanova

Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

* Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region

Цель исследования — изучить влияние острой массивной кровопотери на свойства мускариновых холинорецепторов и каталитических параметров ацетилхолинэстеразы головного мозга белых крыс в отдаленные сроки после реанимации. **Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на наркотизированных нелинейных высокотревожных крысах самцах, подвергнутых 2-х часовой артериальной гипотензии (АД_{ср.} 40–45 мм рт. ст.). Определяли связывание м-холинорецепторов с радиолигандом Н³-хиноклидинилбензилатом по методу Yamamura and Snyder (1974) и каталитические свойства ацетилхолинэстеразы головного мозга крыс на 40-е сутки после реанимации колориметрическим методом (Ellman et al. 1961). **Результаты.** Установлено, что ответ м-холинорецепторов на нарушение холинэргического притока заключается в повышении эффективности их работы за счет повышения аффинности и направлен на обеспечение нормального функционирования синапсов в условиях дефицита холинэргической медиации. **Заключение.** Полученные данные позволяют предположить, что подобная отсроченная гиперкомпенсация холинэргической системы в постреанимационном периоде, является избыточной для нервных клеток головного мозга крыс, перенесших массивную кровопотерю и реанимацию и, вызывая структурную перестройку нервной ткани, может приводить к возникновению новых патологических процессов. **Ключевые слова:** гиповолемическая гипотензия, реинфузия крови, отдаленный постреанимационный период, м-холинорецепторы, ацетилхолинэстераза, ткань мозга, эффективность работы синапсов.

Objective: to study the impact of acute massive blood loss on the properties of muscarinic cholinergic receptors and catalytic parameters of cerebral acetylcholinesterase in albino rats in the late resuscitative periods. **Materials and methods.** Experiments were made on anesthetized non-inbred overanxious male rats exposed to 2-hour arterial hypotension (mean blood pressure 40–45 mm Hg). M-cholinergic receptor binding to the radioligand H³-quinclidinyl benzilate was estimated by the method of Yamamura and Snyder (1974) and the catalytic properties of rat cerebral acetylcholinesterase on postresuscitative day 40 were determined by the colorimetric technique (Ellman et al. 1961). **Results.** A response of m-cholinergic receptors to impaired cholinergic inflow has been found to appear as the higher efficiency of their performance, by increasing affinity and to be aimed at providing the normal functioning of synapses in cholinergic mediation deficiency. **Conclusion.** The findings suggest that this late hypercompensation of the cholinergic system in the postresuscitative period is excessive to the brain nerve cells of the rats experienced massive blood loss and resuscitation and, by causing nerve tissue structural changes, may result in the occurrence of new pathological processes. **Key words:** hypovolemic hypotension, blood reinfusion, late postresuscitative period, m-cholinergic receptors, acetylcholinesterase, brain tissue, efficiency of synaptic performance.

Изучение тонких механизмов нарушений интегративной деятельности мозга при гипоксических и постгипоксических состояниях является проблемой первостепенной важности. В настоящее время установлено, что в постреанимационном периоде развивается сложный комплекс неврологических и психических нарушений, связанных с нарушением интегративной деятельности мозга [1]. Восстановление функций мозга идет медленно, зачастую неполно, что приводит к высокой инвалидизации больных. Основным механизмом нарушения интегративной деятельности мозга, как во время умирания, так и после реанимации является повреждение и гибель нейронов, снижение числа синапсов и плотности дендритной цепи, развивающиеся на фоне выраженных микроциркулятор-

ных нарушений. Нарушения межнейрональной интеграции в постреанимационном периоде затрагивает все уровни организации нервных клеток, что приводит к разрыву нервных цепей. В настоящее время установлено, что нарушение звеньев нейрональной передачи ткани мозга в условиях недостатка кислорода играет существенную роль в формировании постгипоксической патологии ЦНС [1–3]. Рецепторные функциональные системы, как известно, способны взаимодействовать с определенными типами физиологически активных веществ, что является неотъемлемым звеном в реализации физиологического ответа нервной клетки [4, 5]. Согласно современным представлениям специфика ответа нейрона на воздействие нейромедиатора первоначально реализуется на уровне конкретно-

го мембранного рецептора, сопряженного с внутриклеточными эффекторными системами, включающими как регуляторные рецепторы (G-белки, каналы, Ca^{2+} -связывающие белки), так и каталитические компоненты — аденилатциклазу, фосфодиэстеразу, гуанилатциклазу и др. [6–8]. Блокада рецепторов приводит к нарушению информационных процессов в клетке. Снижается активность вторичных мессенджеров, а, следовательно, и энергетических процессов. Формируется порочный круг, когда страдает не только передача импульса в нейроне, но и синтез медиатора. Репаративные процессы, начиная развиваться через 1–7 суток, продолжают в течение 2–3-х месяцев. Значительный вклад в патологию ЦНС вносят нарушения холинергических систем мозга, которые участвуют в таких функциях как память, регуляция движения, уровень бодрствования, обеспечение ориентировочного рефлекса, познавательной функции и др. В частности, в экспериментах на собаках было обнаружено снижение плотности мускариновых холинорецепторов (м-ХР) в коре мозга и стриатуме в постреанимационном периоде у животных, перенесших системную остановку кровообращения в результате электротравмы. Показана положительная корреляция изменений параметров связывания м-ХР со степенью восстановления неврологического статуса и отсутствие полной нормализации количества и свойств рецепторов, активности ферментативных систем, сопряженных с ними, даже у животных с внешне полным восстановлением неврологического статуса через 7–14 дней после реанимации, что может быть причиной недостаточности функций ЦНС [2]. Кроме того, были выявлены различия в молекулярной организации холинергического обмена во фракции тяжелых синапсом неокортекса у низко- и высокоустойчивых крыс к гипобарической гипоксии. В субфракции синаптических мембран активность холинацетилтрансферазы, ацетилхолинэстеразы и Na, K-АТФазы у низкоустойчивых крыс оказалась существенно ниже, чем у высокоустойчивых. Это свидетельствует о более низкой эффективности медиаторной передачи в соответствующих холинергических нейронах низкоустойчивых крыс. В то же время повышенная концентрация нехолинергических, но ацетилхолинэстераз-реактивных синапсов в неокортексе и гиппокампе низкоустойчивых крыс указывает на различное распределение холинергических влияний в обеих структурах мозга у интактных крыс с низкой и высокой устойчивостью к кислородной недостаточности. Это может иметь большое значение при специфических механизмах адаптации и/или патологии мозга в ответ на гипоксические или ишемические воздействия [9].

Ранее нами было установлено, что изменение параметров связывания м-ХР в постреанимационном периоде зависит от исходного типа поведения крыс. Мускариновые холинорецепторы мозга у высокотревожных крыс, перенесших 1-часовую артериальную гипотензию (AD_{cp} , 40–45 мм рт. ст.) по сравнению с низкотревожными обладают низкой афферентностью, что ухудшает эффективность связывания медиатора в отдаленные сроки после реинфузии крови. В то же время, у низкотревожных животных (активная стратегия поведения) каких-либо зна-

чительных изменений в холинергической системе мозга через 1 месяц после реанимации не наблюдалось [10].

Принимая во внимание, что состояние мускариновых холинорецепторов и свойства ацетилхолинэстеразы (АХЭ), являющейся ключевым ферментом этой медиаторной системы, играют важную роль в восстановлении интегративной деятельности мозга, можно предположить, что эти системы могут быть вовлечены в патологический процесс при острой массивной кровопотере.

Цель исследования — изучить влияние острой массивной кровопотери на свойства мускариновых холинорецепторов и каталитические свойства ацетилхолинэстеразы головного мозга белых крыс в отдаленные сроки после реанимации.

Материалы и методы

Опыты выполнены на нелинейных высокотревожных белых крысах самцах массой 300–350 г (21 животное) под нембуталовым наркозом (25 мг/кг внутривенно). Моделью острой массивной кровопотери была 2-х часовая артериальная гипотензия (AD_{cp} — 40–45 мм рт. ст.) с последующей реинфузией выпущенной крови. Кровопотерю проводили из хвостовой артерии, в которую за 15 мин до кровопотери вводили гепарин (500 МЕ/кг). Объем кровопотери составил 20 мл/кг массы тела. Исследование свойств м-холинорецепторов и каталитических свойств ацетилхолинэстеразы проводили через 40 суток после шока с использованием синаптосомальной фракции гомогената головного мозга крыс после деканитации. Опытную группу составили 14 животных. Контролем служили 7 ложно-оперированных крыс.

Определение свойств м-холинорецепторов. Для определения связывания м-холинорецептора с радиолигандом использовали высокоактивный селективный антагонист мускариновых холинорецепторов H^3 -хинуклидинилбензилат ($[^3H]$ -QNB, 38 Ci/mmol, Amersham, England). Связывание проводили по методу Н. I. Yamamura и S. H. Snyder [11] в модификации V. Malygin et al. [12]. Головной мозг крыс гомогенизировали в гомогенизаторе Polytron PT10 (setting 9,2×10s) в 10 объемах 0,05M Na^+/K^+ фосфат/EDTA буфера (pH 7,4). Затем гомогенат центрифугировали (30000g в течение 10 мин), осадок ресуспендировали в холодном буфере и центрифугировали (25000g в течение 15 мин) дважды. Гомогенат (0,8–0,9 мг белка на реакцию) инкубировали в течение 60 мин при 37°C в 1 мл 0,05 M Na^+/K^+ фосфат/EDTA буфера (pH 7,4) с 8 различными концентрациями (0,008–0,5 nM) $[^3H]$ -QNB. После инкубации свободный и связанный лиганд разделяли методом вакуумного фильтрования через стекловолоконные фильтры Whatman GF/B. Радиоактивность фильтров определяли в сцинтилляторе Брея на жидкостном спектрометре. Неспецифическое связывание определяли в присутствии немеченного QNB.

Изотермы связывания рецепторов с лигандом (K_d — аффинность; V_{max} — плотность рецепторов) анализировали, используя методы нелинейной регрессии («LIGAND» на IBM PC).

Определение активности ацетилхолинэстеразы. Активность АХЭ определяли колориметрическим методом G. L. Ellman et al. [13], используя ацетилтиохолин в качестве субстрата, в 0,1M фосфатном буфере (pH 7,4, 25°C) при концентрации белка 0,10–0,15 мг/мл. Кинетические параметры гидролиза ацетилтиохолина под действием АХЭ — V_{max} (максимальная скорость) и K_m (константа Михаэлиса) рассчитывали в координатах Lineweaver-Burk методом линейной регрессии (ORIGIN 6.1). Концентрацию белка определяли методом Lowry [14].

Результаты и обсуждение

Как видно из табл. 1, у животных, перенесших 2-х часовую артериальную гипотензию (AD_{cp} , 40–45 мм рт. ст.),

**Параметры связывания [³H]-QNB с мускариновыми холинорецепторами (МХР)
и кинетические параметры гидролиза ацетилхолина под действием ацетилхолинэстеразы (АХЭ)
головного мозга крыс через 40 суток после реанимации**

| Группа | Значение показателей в группах | | | | | |
|-------------|--------------------------------|------------------|-------------|----------------|------------------|-----------|
| | МХР | | АХЭ | | | |
| | Kd | V _{max} | Ke | Km | V _{max} | Ke |
| Опытная | 0,0151±0,0004* | 327,5±11,6* | 21,63±0,40* | 0,0948±0,0044* | 0,292±0,017 | 3,13±0,20 |
| Контрольная | 0,0196±0,0007 | 226,2±7,5 | 11,61±0,47 | 0,0759±0,0050 | 0,267±0,020 | 3,53±0,08 |

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю. V_{max}, pmole/мг белка; Kd, nM; Ke = V_{max}/Kd × 10⁻³; V_{max}, ед. D/мин. мг белка; Km, mM; Ke (АХЭ) = V_{max}/Km.

после успешной реанимации наблюдаются существенные изменения параметров связывания м-ХР и каталитической активности АХЭ головного мозга крыс. Прежде всего, следует отметить, что артериальная гипотензия и последующий постреанимационный процесс приводят к изменению свойств м-ХР. Наблюдается достоверное повышение аффинности м-ХР (снижение Kd по абсолютной величине) при существенном повышении их плотности (показатель V_{max}). Полученные данные характеризуют существенное и устойчивое повышение эффективности работы синапса (Ke = V_{max} / Kd · 10⁻³), которая возрастает почти в 2 раза по сравнению с контрольными животными. В то же время величина константы Михаэлиса (Km) увеличивается, что свидетельствует об ухудшении свойств АХЭ, т. е. имеет место ухудшение связывания фермента с субстратом, при неизменной максимальной скорости его гидролиза (V_{max}). Несколько снизился и показатель эффективности работы АХЭ — Ke (Ke = V_{max}/Km). Анализ данных литературы и полученные результаты говорят о высокой функциональной пластичности синапсов в постгипоксическом мозге, несмотря на глубокие изменения метаболизма в нейронах и состояния эффекторных внутриклеточных систем, сопряженных с рецепторами [15]. Наблюдаемые изменения по своему физиологическому значению однонаправлены и носят компенсаторный характер (up-regulation), т. к. и повышенные аффинности м-ХР к ацетилхолину и ухудшение ката-

литических свойств АХЭ (возрастание Km) направлены на обеспечение нормального функционирования синапсов. Настоящие результаты изменения свойств м-ХР и АХЭ головного мозга крыс в отдаленные сроки после массивной кровопотери и успешной реанимации близки по своей направленности к данным, полученным при моделировании похожих нейромедиаторных состояний (болезнь Альцгеймера) путем однократного введения экзотоксикантов — хиноклидинилбензилата и амизила. Введение холинолитика также приводило к повышению сродства м-ХР, причем не только к антагонистам, но и к агонистам м-ХР, увеличивая «эффективность» агониста, его способность не только связываться, но и возбуждать рецептор [16].

Полученные результаты позволяют предположить, что ответ м-ХР на нарушение холинергического притока заключается в повышении эффективности их работы, причем, достигается она, прежде всего, за счет повышения аффинности и направлена на обеспечение нормального функционирования синапсов в условиях дефицита холинергической медиации. Подобная отсроченная гиперкомпенсация холинергической системы, наблюдаемая в наших экспериментах, очевидно, является избыточной для нервных клеток головного мозга крыс, перенесших массивную кровопотерю и реанимацию и, вызывая структурную перестройку нервной ткани, может приводить к возникновению новых патологических процессов.

Литература

- Неговский В. А. Неврологические аспекты реаниматологии. Центральная нервная система и постреанимационная патология организма. В кн.: Центральная нервная система и постреанимационная патология организма: Тр. Междунар. симпозиум, посвящ. 80-летию акад. АМН СССР В. А. Неговского, 14–16 марта 1989, г. Москва. М.; 1991. 3–11.
- Неговский В. А., Пылова С. И. Состояние нейрорецепторов в динамике постреанимационного периода. Вестн. Рос. акад. мед. наук 1992; 7: 32–35.
- Крыжановский Г. Н. (ред). Дисрегуляторная патология. М.; 2002. 18–78.
- Сергеев П. В., Шимановский Н. Л. Рецепторы. М.; 1987. 82–132.
- Ткачук В. А. Введение в молекулярную эндокринологию. М.; 1983. 110–144.
- Siesjo B. K., Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression. A unifying hypothesis. J. Cerebral. Blood Flow Metab. 1989. 9: 127–140.
- Авдонин П. В., Ткачук И. А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. М.: Наука; 1994.
- Kristiansen K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. Pharmacol. Ther. 2004; 103 (1): 21–80.
- Захарова Е. И., Лукьянова Л. Д., Иванов Д. С. Сравнительная характеристика холинергических систем неокортекса и гиппокампа мозга крыс с низкой и высокой устойчивостью к гипоксии. Бюл. эксперим. биол. и мед. 1998; 5: 521–525.
- Бастрикова Н. А., Малыгин В. В., Серебрякова О. Г. и др. Отличия в отсроченном ответе холинергической системы мозга на геморрагический шок у крыс с разным исходным уровнем тревожности. В кн.: 2 Рос. конгр. по патофизиологии. М.; 2000. 286.
- Yamamura H. I., Snyder S. H. Muscarinic cholinergic receptor binding in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1974; 7: 1725–1729.
- Malygin V., Serebryakova O., Yevdokimenko S., Makhaeva G. A Test-system for radioreceptor binding assay using a lyophilized membranes preparation of the rat brain. Developments animal veterinary sciences (DAVS) 1997; 27: 887–894.
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 1961; 7: 88–95.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265–275.
- Семченко В. В., Степанов С. С., Акулинин В. А., Никель А. Э. Структурные механизмы нарушения и восстановления интегративной деятельности мозга в постреанимационном периоде. В кн.: Центральная нервная система и постреанимационная патология организма: Тр. Междунар. симпозиум, посвящ. 80-летию акад. АМН СССР В. А. Неговского, 14–16 марта 1989, г. Москва. М.; 1991. 47–52.
- Малыгин В. В., Серебрякова О. Г., Махаева Г. Ф. Изменение свойств М-холинорецепторов и ацетилхолинэстеразы головного мозга белых крыс при моделировании нейродегенеративных состояний типа болезни Альцгеймера (радиорецепторное исследование). В кн.: Гаврилова С. И. (ред.) Болезнь Альцгеймера и старение: от нейробиологии к терапии. Материалы 2 Рос. конгр. 1999 г.

Поступила 02.11.06