

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
РАБОТЫ

УДК 577.3

**ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ  
ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНАПТИЧЕСКОЙ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ  
ПРИ СУБТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС**

© 2021 г. Н. К. Кличханов<sup>1</sup>, А. М. Джафарова<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет», Махачкала, Россия

Поступила в редакцию 05.03.2021 г.

После доработки 12.03.2021 г.

Принята к публикации 16.03.2021 г.

Острая ишемия мозга инициирует каскад реакций, результатом которых может стать развитие окислительного стресса и нарушение сбалансированной работы ряда нейромедиаторных систем мозга. Протекторные эффекты терапевтической гипотермии при ишемии достаточно известны и изучены, однако механизмы ее воздействия на холинэргическую систему мозга, тесно связанную с функционированием ацетилхолинэстеразы (АХЭ), остаются невыясненными. В данной работе исследованы активность и кинетические параметры АХЭ, а также взаимосвязь между каталитическими свойствами фермента и интенсивностью свободно-радикальных процессов в синаптических окончаниях нейронов мозга крыс при окклюзии сонных артерий в условиях нормотермии и умеренной (33°C) гипотермии. Обнаружено, что церебральная ишемия приводит к снижению активности АХЭ, в то время как гипотермия в период окклюзии сонных артерий препятствует этому. При ишемии мозга значение  $V_{max}$  и эффективность катализа АХЭ снижаются, а  $K_i$  увеличивается, что на фоне неизменных значений  $K_m$  способствует повышению диапазона эффективных концентраций ацетилтиохолина и значений  $[S]_{0.5}$ . Мягкая гипотермия на фоне ишемии мозга препятствует существенным изменениям кинетических параметров фермента. Ишемия стимулирует процессы окислительной деструкции мембранных белков и липидов. Гипотермия во время ишемии предотвращает повышение уровней продуктов окислительной модификации липидов и белков, а также активности супероксиддисмутазы в синапсосомах. Обнаружена отрицательная корреляция между значениями кинетических параметров АХЭ и уровнями продуктов окислительной модификации липидов и белков синапсом, что указывает на важную роль активных форм кислорода в модуляции активности ключевого фермента холинэргической системы. Полученные результаты позволяют сделать заключение, что гипотермия во время ишемии предотвращает активацию свободнорадикальных процессов в синаптических окончаниях нейронов, что, в свою очередь, препятствует снижению активности и эффективности катализа АХЭ.

*Ключевые слова:* субтотальная ишемия, гипотермия, мозг, синаптические мембраны, АХЭ, кинетические параметры, малоновый диальдегид, карбонильные группы, супероксиддисмутаза, каталаза

**DOI:** 10.31857/S1027813321030080

**ВВЕДЕНИЕ**

Церебральная ишемия возникает из-за дефицита кровоснабжения мозга, что, в свою очередь, инициирует каскад событий, приводящих к ряду важных клеточных изменений, которые развиваются во времени и в пространстве. Они включают в себя быстрое снижение уровня АТФ, нарушение ионного гомеостаза, избыточное накопление возбуждающих аминокислот, обладающих нейротоксическим действием, дисфункции митохондрий и эндоплазматического ретикулума, активация гидролитических ферментов и возрастание активных

форм кислорода (АФК) и азота (АФА), индуцирующих развитие окислительного стресса [1, 2]. Головной мозг особенно уязвим к окислительному повреждению из-за низкого запаса источников энергии, высокого аэробного метаболизма, относительно низкой активности антиоксидантных ферментов, а также высокого содержания субстратов окисления и металлов с переменной валентностью [3, 4]. Исследования последних лет выявили связь между избыточным образованием АФК и развитием гибели нейронов при острой церебральной ишемии [5]. Чрезмерная генерация АФК и АФА может вызывать функциональное и структурное повреждение нейрональных клеток

\* Адресат для корреспонденции: 367000 Россия, Республика Дагестан, Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а, e-mail: albi-na19764@mail.ru.

и играть важную роль в патофизиологии церебральной ишемии [6].

Роль окислительного стресса становится более значимой после возобновления кровообращения после периода ишемии, называемого реперфузией, поскольку восстановление кровотока в ишемическом мозге способствует возрастанию парциального давления кислорода в тканях головного мозга. Образующиеся при этом  $O_2^-$  и  $NO^*$  принимают непосредственное участие в отсроченной гибели нейронов периферической области [3, 7, 8].

Известно, что устойчивость мозга к дефициту кровоснабжения может повышаться при снижении температуры тела [9]. Основной причиной защитного эффекта гипотермии при ишемических состояниях головного мозга является снижение потребления кислорода и сохранение запасов глюкозы. Гипотермия переводит организм на низкую метаболическую активность, при которой большинство физиологических и патофизиологических процессов находятся на низком уровне. Особенно эффективным является мягкая гипотермия (33–35°C). Нейропротекторные механизмы гипотермии обычно связывают со снижением скорости обмена веществ и последующего истощения энергии, уменьшением секреции эксайтотоксических нейромедиаторов, предотвращением разрушения гематоэнцефалического барьера и последующего формирования мозгового отека, уменьшением образования свободных кислородных радикалов, подавлением специфических путей гибели клеток [10, 11].

Холинергические нейроны и их проекции широко распространены по всей центральной нервной системе. Их высокая плотность в таламусе, стриатуме, лимбической системе и неокортексе позволяет предположить, что холинергическая передача особенно важна для регулирования таких функций, как обучение, память, корковая организация движения и контроль мозгового кровотока [12, 13]. Ацетилхолинэстераза (АХЭ; КФ 3.1.1.7) является одним из ключевых ферментов этой системы и часто используется в качестве маркера его функционирования. АХЭ представляет собой фермент из группы сериновых эстераз, который осуществляет гидролиз нейромедиатора ацетилхолина (АХ) в холинергических синапсах, обеспечивая прерывистость нервного импульса, ответственного за нейронную связь. Этот фермент широко экспрессируется в мозге и тканях, имеющих холинергическую иннервацию [14, 15]. АХЭ локализована на внешней поверхности синаптических мембран и гидролизует АХ, поступающий в синаптическую щель в ответ на входящий в терминаль нервный импульс [16]. Следует отметить, что АХЭ вносит существенный вклад в синаптическую передачу не только в холинергических нейронах, но также в дофаминергических и

глутаматергических синапсах [17]. АХЭ присутствует в нейронах в мембраносвязанной и растворимой формах [18].

Установлено, что повреждение нейронов, связанное с ишемией, сопровождается изменением в холинергической системе мозга [19, 20]. Например, после окклюзии средней мозговой артерии обнаружено нарушение функции холинергического пути между лобной корой головного мозга и базальным ядром Мейнерта [21]. Показано, что уровень АХ в ткани мозга изменяется как во время ишемии, так и в постинфарктном периоде [22]. По данным различных авторов, активность АХЭ в головном мозге в модели экспериментальной церебральной ишемии снижалась [23–26]. По данным Ванга и сотр. [27], через сутки после 45 мин окклюзии среднемозговой артерии активность АХЭ в коре головного мозга крыс достоверно снижалась. Существенное снижение активности АХЭ мозга было обнаружено через 7 сут после 15 мин окклюзии сонных артерий у крыс [28]. В то же время иммуногистохимические данные свидетельствуют о повышении уровня АХЭ в мозге уже через 0.5 ч после реперфузии, пик увеличения которого достигался через 12 ч реперфузии после окклюзии среднемозговой артерии [29]. Ясно, что на молекулярные события, лежащие в основе вызванных ишемией изменений активности АХЭ, может повлиять использованная модель ишемии, ее характер — является ли окклюзия обратимой или постоянной, а также тяжесть ишемии ткани за период исследования. Несмотря на неоднозначность данных, все эти исследования позволяют предположить, что активность АХЭ может изменяться во время и после ишемического повреждения мозга. Однако в этих работах активность АХЭ исследовалась в гомогенатах мозга, а не на уровне синаптических мембран, где, в основном, и локализуется фермент, мало уделено внимания изменениям ее кинетических характеристик, а также не изучено влияние гипотермии на эти параметры фермента при ишемии.

Целью данной работы является выяснение характера изменения кинетических параметров АХЭ синаптических мембран мозга при ишемии и гипотермии, а также установление связи между активностью фермента и интенсивностью свободнорадикальных процессов в синаптических окончаниях нейронов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты выполнены на белых крысах-самцах Вистар, массой 220–230 г, полученных из питомника “Столбовая” ГУ НЦ (г. Чехов). Животных содержали в стандартных условиях вивария Дагестанского государственного университета со свободным доступом к воде и пище при окружающей температуре  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  и режимом освещения свет-

темнота 12 : 12 ч. Эксперименты выполнены с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199н). Животные были случайным образом разделены на 3 группы по 10 крыс в каждой: 1) контроль (ложно-оперированные животные); 2) ишемия мозга в течение 60 мин; 3) ишемия 60 мин на фоне гипотермии 33°C.

**Моделирование неполной ишемии мозга у крыс.** Ишемия головного мозга осуществлялась полной перевязкой обеих сонных артерий в течение 60 мин. У животных контрольной группы воспроизводилась наркотизация, кожный разрез и выделение артерий без последующей перевязки сосудов. Все хирургические процедуры проводили под наркозом (внутрибрюшное введение тиопентала натрия в дозе 40–50 мг/кг). В период ишемии температуру тела животного поддерживали на нормальном уровне (37°C), используя тепло настольной лампы.

**Условия моделирования гипотермии.** Непосредственно перед окклюзией сонных артерий температуру тела животного снижали до 33°C, обкладывая тело животного целлофановым пакетом с мелко колотым льдом. Температуру тела измеряли ректальным цифровым термометром MS6501 (Mastech, Гонконг), датчик которого вводили в прямую кишку на глубину 3–4 см.

**Выделение синаптических мембран.** После декапитации животного быстро извлекали головной мозг, промывали в ледяном 0.9%-ном растворе NaCl, очищали от мозговых оболочек и выделяли кору больших полушарий мозга. Фракцию синапсом выделяли методом дифференциального центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (AppliChem, Германия) [30]. Мозг гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера в 10-кратном объеме охлажденного (0–4°C) изотонического раствора, содержащего 0.32 М сахарозу, 0.2 мМ ЭДТА (AppliChem, Германия) и 10 мМ трис-НСl (рН 7.4). Полученный гомогенат центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде гомогенизации и вновь центрифугировали в тех же условиях. Объединенный супернатант центрифугировали при 11500 g в течение 20 мин на центрифуге MR 23i (Thermo Fisher Scientific, США). Полученный осадок (грубая митохондриальная фракция) суспендировали в 3 мл 0.32 М сахарозы, наслаивали на градиент сахарозы (0.8 и 1.2 М) и центрифугировали при 100000 g в течение 1 ч на ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, США). Фракцию синапсом собирали на границе 0.8 и 1.2 М сахарозы. Мембраны синапсом получали после гипоосмотического шока, для чего к осадку синапсом добавляли 3.0 мл холодной бидистиллированной воды и выдерживали их на холоде в течение 1 ч при периодическом перемешивании. Мембраны осаждали

при 32000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость – содержимое синапсом (названную нами в этой работе синаптоплазмой) отбирали и использовали для определения активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Мембраны синапсом дважды промывали в 40 мМ Tris-НСl, рН 7.4, при 32000 g в течение 10 мин. Получившийся осадок синаптических мембран ресуспендировали в 5 мМ Трис НСl-буфере (рН 7.4) и хранили до использования при –70°C. Все процедуры были выполнены при температуре 4°C.

**Определение содержания белка.** Белок во фракции синаптических мембран определяли по методу Лоури [31].

**Определение кинетических характеристик АХЭ.** Активность АХЭ определяли методом Элмана с сотр. [32] с ацетилтиохолином (АТХ) (Koch Light, Великобритания) в качестве субстрата. В термостатируемую при 37°C кювету спектрофотометра ПЭ 3000УФ (Шанхай, Китай) вносили 1.45 мл 0.1 М фосфатного буфера, рН 8.0, 0.05 мл суспензии мембран синапсом (40–50 мкг белка) и 0.05 мл 0.01 М раствора 5,5'-дителиобис-(2-нитробензойной кислоты) (Koch Light, Великобритания). Реакцию запускали добавлением 0.02 мл раствора АТХ. Изменение оптической плотности раствора в ходе гидролиза АТХ, катализируемой АХЭ, регистрировали при 412 нм в течение 5 мин с интервалом 20 с. Параллельно регистрировали изменение оптической плотности контрольного раствора, в который вместо суспензии мембран вносили соответствующий объем 0.1 М фосфатного буфера. Активность фермента рассчитывали, используя коэффициент молярного поглощения желтого аниона 5-тио-2-нитро-бензоата, который равен  $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  и выражали в мкмоль/мин мг белка.

Для определения кинетических характеристик АХЭ измеряли зависимость скорости гидролиза от концентрации АТХ в диапазоне  $1.56 \times 10^{-5}$ – $6.4 \times 10^{-2}$  М. В этих исследованиях использовали 0.036 М фосфатный буфер, рН 8.0. При изменении концентрации АТХ ионную силу реакционной среды поддерживали на уровне 0.1 М путем добавления в пробу соответствующего количества NaCl. При концентрациях АТХ, превышающих 1.0 мМ, ферментативная активность была скорректирована с учетом спонтанного неферментативного гидролиза субстрата.

Особенностью катализа АХЭ является наличие субстратного ингибирования, для объяснения и описания которого были предложены различные кинетические модели [33–35]. В модели, предложенной Стояном с сотр. [33], механизм ингибирования АХЭ зависит от концентрации субстрата: умеренно высокие ( $[S] < 100 \text{ мМ}$ ) или высокие ( $[S] > 100 \text{ мМ}$ ). В настоящем исследовании были

использованы умеренно высокие концентрации субстрата (<64 мМ). Для описания этой модели наиболее приемлемым является уравнение Холдейна–Радича [36]. Однако из-за высокой скорости катализа фермента не всегда удается экспериментально вычислить константы скорости образования и распада всех интермедиатов реакции, особенно когда исследуется не очищенный фермент, а фермент в составе нативных мембран. В этом случае при расчете кинетических характеристик АХЭ целесообразным считают использование упрощенного уравнения Холдейна [34]:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S] + [S]^2/K_i}, \quad (1)$$

где  $v$  – скорость реакции,  $V_{\max}$  – максимальная скорость,  $K_m$  – константа Михаэлиса,  $K_i$  – константа субстратного ингибирования.

Данное уравнение нами было использовано для расчета кинетических характеристик фермента с помощью многомерного нелинейного регрессионного анализа.

**Определение веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) в синапсомемах.** Перекисное окисление липидов (ПОЛ) анализировали путем измерения реактивных веществ, реагирующих с ТБК (ТБКРВ), в результате которого измеряется, в основном, образование малонового диальдегида (МДА) [37]. При этом определяли исходный уровень ТБКРВ и их накопление *in vitro* в присутствии инициаторов ПОЛ –  $Fe^{2+}$ -аскорбата. Для определения исходного уровня ТБКРВ, к 1.8 мл буферно-солевой среды (БСС), содержащей 132 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л KCl, 1.3 ммоль/л  $MgCl_2$ , 1.2 ммоль/л  $NaH_2PO_4$ , 1.0 ммоль/л  $CaCl_2$  и 10 ммоль/л трис-HCl буфер, pH 7.4, последовательно добавляли 0.2 мл суспензии синапсомем (1–2 мг/мл белка), 1 мл 10%-ной ТХУ (Acros Organics, Бельгия) и 1 мл 0.67%-ной ТБК (Sigma, США). Пробы нагревали до 100°C в течение 15 мин, а затем центрифугировали при 600 g в течение 10 мин. В супернатанте на спектрофотометре ПЭ 3000УФ (Шанхай, Китай) определяли оптическую плотность при 532 и 560 нм против контрольной пробы, не содержащей суспензию синапсомем. При определении ПОЛ, индуцированного системой  $Fe^{2+}$ -аскорбат, к 1.4 мл БСС, добавляли 0.2 мл суспензии синапсомем (1–2 мг/мл белка), 0.2 мл 0.5 мМ аскорбата и 0.2 мл 12 мкМ соли Мора ( $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ). Пробы инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Дальнейшие измерения проводили как при определении исходного уровня ТБКРВ. Разность оптических плотностей ( $E_{532} - E_{560}$ ) использовали для определения концентрации ТБКРВ, используя коэффициент молярной экстинкции МДА, равный  $1.56 \times 10^5$  л/М см.

**Определение карбонильных групп в белках мембран синапсомем.** Содержание карбонильных групп в белках мембран синапсомем измеряли в соответствии с методом, описанным Venditti et al. [38] с некоторыми изменениями. При этом определяли исходный уровень карбонильных групп, а также их накопление под действием генерируемых в среде инкубации оксидантов. Для определения исходного уровня карбонильных групп, 0.2 мл суспензии мембран (2.5 мг/мл белка) смешивали с 0.2 мл 20%-ной ТХУ. Для запуска процессов окислительной модификации белков *in vitro* с образованием карбонильных групп, суспензию мембран синапсомем (~2.5 мг/мл белка) инкубировали с  $10^{-3}$  М  $Fe^{2+}$ ,  $10^{-3}$  М ЭДТА и  $3 \times 10^{-4}$  М  $H_2O_2$  в течение 15 мин при 37°C, после чего смешивали с 0.2 мл 20%-ной ТХУ. Во всех пробах белки осаждали центрифугированием при 1500 g в течение 10 минут. К осадку белков (~0.5 мг белка), после растворения в 100 мкл 0.1 М NaOH, добавляли 1 мл 10 мМ 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) (Sigma, США) в 2 М HCl, смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, время от времени встряхивая. В контрольный образец добавляли только 2 М HCl. Затем во все пробы добавляли 20%-ную ТХУ и инкубировали в течение 10 мин на ледяной бане. Затем пробы центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин для осаждения белков. Для удаления непрореагировавших ДНФГ и остатка липидов осажденные белки трижды промывали смесью этанол : этилацетат (1 : 1, об./об.). Конечный осадок белков растворяли в 6 М растворе гуанидин гидрохлорида. Оптическую плотность полученного белкового раствора регистрировали при 370 нм. Определяли разницу в оптической плотности пробы по отношению к контролю и рассчитывали количество карбонильных групп в нмоль на мг белка, используя молярный коэффициент экстинкции  $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**Определение активности СОД.** Суммарную активность СОД в синаптоплазме определяли адренхромовым методом, основанным на спонтанном автоокислении адреналина с образованием диформаза, имеющего максимум поглощения при 560 нм [39]. Скорость реакции образования диформаза оценивали по изменению оптической плотности в единицу времени. В опытную пробу вносили 3.67 мл 0.2 М бикарбонатного буфера, pH 9.7, 0.1 мл 2.4 мМ нитросинего тетразолия (НСТ) (Sigma, США), 0.03 мл синаптоплазмы и 0.2 мл 0.1%-ного раствора адреналина. В контрольную пробу добавляли 3.87 мл 0.2 М бикарбонатного буфера (pH 9.7), 0.1 мл 2.4 мМ НСТ и 0.03 мл синаптоплазмы. Количество фермента, которое вызывало 50%-ное ингибирование автоокисления адреналина, принимали за 1 условную единицу (у. е.). Активность СОД была выражена в у. е. на мг белка.

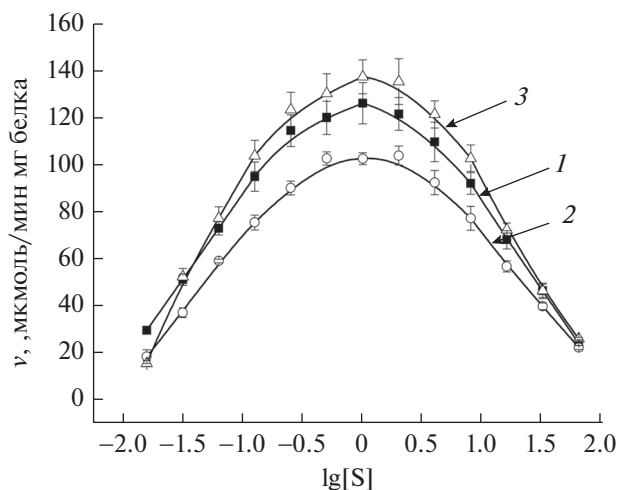
**Определение активности каталазы (КАТ).** Активность КАТ определяли в синаптоплазме при 37°C с помощью спектрофотометра ПЭ-3000УФ (Шанхай, Китай) по методу Аеби [40]. Синаптоплазма (0.03 мг белка) добавляли к 1 мл реакционной смеси, содержащей 100 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7.4, и 8.8 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Уменьшение поглощения при 240 нм контролировали в течение 3 мин при 37°C. Активность КАТ выражали в мкМ/мин мг белка.

**Статистическая обработка.** Обработка данных произведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., США). Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро–Уилка. Достоверность различий между нормально распределенными данными определяли с помощью критерия Фишера на уровне значимости  $p \leq 0.05$ . Для оценки взаимосвязи между нормально распределенными переменными был использован корреляционный анализ Пирсона. Данные в таблицах приведены в виде: среднее  $\pm$  ошибка среднего. Каждая кривая на графиках концентрационной зависимости скорости гидролиза АТХ – среднее 10-ти независимых экспериментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как видно на рис. 1, график концентрационной зависимости активности АХЭ у контрольных животных имеет характерную колоколообразную форму, т.е. скорость гидролиза растет до определенного оптимального значения концентрации субстрата ( $[S]_{\text{опт}}$ ), затем по мере дальнейшего увеличения концентрации АТХ падает. Таким образом, кинетика ацетилхолинэстеразной реакции характеризуется наличием субстратного ингибирования, что согласуется с литературными данными [35]. Характер концентрационной зависимости активности АХЭ не изменяется при ишемии, а также на фоне гипотермии (рис. 1).

При всех исследованных состояниях наиболее высокая активность АХЭ соответствует концентрации АТХ, приблизительно равной 1 мМ (рис. 1). Абсолютное значение оптимальной



**Рис. 1.** Концентрационная зависимость активности АХЭ синаптических мембран коры головного мозга крыс: 1 – контроль; 2 – ишемия 60 мин; 3 – ишемия 60 мин на фоне гипотермии 33°C ( $n = 10$ ).

концентрации субстрата ( $[S]_{\text{опт}}$ ), вычисленное из уравнения (2):

$$[S]_{\text{опт}} = \sqrt{K_m K_i} \quad (2)$$

существенно не отличаются от значений, найденных по графику (табл. 1).

Церебральная ишемия приводит к снижению активности АХЭ при всех исследованных концентрациях субстрата (рис. 1, табл. 1). Так, например, при концентрации субстрата, равной 1 мМ, уменьшение активности АХЭ составляет 18.8% относительно контроля (в контроле  $126.16 \pm 8.79$  мкмоль/мин мг, при ишемии –  $102.55 \pm 2.54$  мкмоль/мин мг;  $p < 0.05$ ). При этом наблюдается незначительное смещение  $[S]_{\text{опт}}$ , но ее величина достоверно не отличается от значения в контроле (табл. 1).

Снижение температуры тела до 33°C в период окклюзии сонных артерий мозга крыс способствует сохранению активности АХЭ на уровне контроля, а в диапазоне концентраций  $1.25 \times 10^{-4}$ – $0.8 \times 10^{-2}$  М АТХ-активность фермента становится незначительно выше по сравнению с контролем (рис. 1).

**Таблица 1.** Кинетические характеристики АХЭ мембран синапсом коры головного мозга крыс при ишемии/реперфузии и гипотермии ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

Состояние животного	$V_{\text{max}}$ , мкмоль/мин мг белка	$K_m$ , мМ	$V_{\text{max}}/K_m$	$K_i$ , мМ	$[S]_{\text{опт}}$ , мМ
Контроль	$144.5 \pm 8.6$	$0.063 \pm 0.002$	$2293.6 \pm 102.4$	$12.76 \pm 1.02$	$0.890 \pm 0.039$
Ишемия 60 мин	$118.7 \pm 3.8^*$	$0.069 \pm 0.005$	$1721.1 \pm 94.5^*$	$15.20 \pm 0.34^*$	$1.024 \pm 0.063$
Ишемия 60 мин + гипотермия	$158.9 \pm 10.7^\#$	$0.071 \pm 0.003$	$2225.3 \pm 154.2^\#$	$13.62 \pm 0.68$	$0.983 \pm 0.029$

Примечание: достоверные различия \* – относительно контроля; # – относительно ишемии.

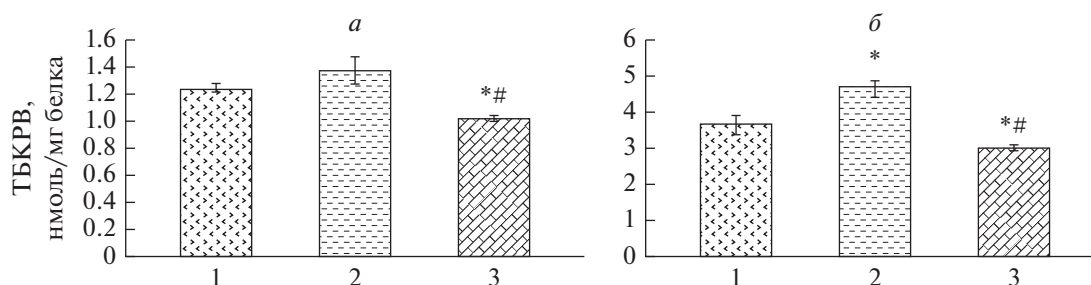


Рис. 2. Содержание ТБКРВ (а) и скорость их накопления в присутствии прооксидантов (б) в синапсомемах из коры головного мозга крыс при ишемии и гипотермии ( $n = 10$ ): 1 – контроль, 2 – ишемия, 3 – ишемия + гипотермия. Достоверные различия: \* – относительно контроля, # – относительно ишемии.

Анализ кинетических характеристик АХЭ синаптических мембран мозга показал, что значение  $V_{\max}$  при ишемии снижается на 18.1% относительно контроля (табл. 1), а изменения константы Михаэлиса незначительны. Мы рассчитали отношение  $V_{\max}/K_m$ , которое отражает относительную эффективность катализа при физиологических концентрациях субстрата. Оказалось, что при ишемии эффективность катализа становится на 25% ниже уровня контроля (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что константа ингибирования ( $K_i$ ), которая является мерой сродства субстрата к периферическому месту связывания, при ишемии увеличивается на 19%, что на фоне неизменных значений  $K_m$  способствует повышению диапазона эффективных концентраций АТХ и теоретических значений  $[S]_{\text{опт}}$  АХЭ, вычисленных по формуле (2).

Корреляционный анализ показал слабую связь между значениями  $K_m$  и  $K_i$  при исследованных состояниях животных ( $r = 0.59$ ;  $p > 0.05$ ). С биофизической точки зрения это вполне возможно, так как периферическое место связывания, ответственное за субстратное ингибирование, находится на периферии и никак не связано с активным центром и конформационной динамикой молекулы АХЭ. Достоверное повышение  $K_i$  при ишемии свидетельствует об ослаблении прочности тройного комплекса SES в схеме субстратного ингибирования фермента [35].

Мягкая гипотермия на фоне субтотальной ишемии мозга препятствует снижению  $V_{\max}$  фермента (табл. 1). При этом значения  $K_m$  достоверно не отличаются от контроля, что способствует нормализации уровня эффективности катализа. Кроме того, наблюдается нормализация и таких параметров, как  $K_i$  и  $[S]_{\text{опт}}$ .

АХЭ заякорена в липидной матрице мембраны. Обнаружены изменения активности и кинетических параметров АХЭ могут быть индуцированы окислительными модификациями молекул как самого фермента, так и белков и липидов в его микроокружении. Для того, чтобы оценить уровень окислительной модификации липидов и белков

мембран синапсоме, обусловленный АФК, мы определили количество ТБКРВ и карбонильных групп. Анализ интенсивности ПОЛ в синапсомемах после острой ишемии не выявил изменения исходного уровня ТБКРВ, но установил достоверный рост их накопления в инкубируемых *in vitro* среде  $\text{Fe}^{2+}$ -аскорбат пробах (рис. 2).

Снижение температуры тела во время ишемии предотвращает активацию процессов перекисидации липидов мембран синапсоме. При этом как исходный, так и индуцированный уровень ТБКРВ в синапсомемах снижается не только относительно значений у ишемизированных животных, но и значений контроля. Обнаружена корреляция между кинетическими параметрами АХЭ и содержанием продуктов ПОЛ в синапсомемах. Так, между значениями  $V_{\max}$  и уровнями ТБКРВ обнаружены отрицательные корреляции ( $r = -0.95$  для исходных и  $r = -1$  для индуцированных процессов,  $p < 0.05$ ). Отрицательные корреляции обнаружены также между значениями показателя эффективности катализа АХЭ и ТБКРВ ( $r = -0.70$  для исходных и  $r = -0.87$  для индуцированных процессов,  $p < 0.05$ ).

АФК и продукты ПОЛ, образующиеся в мозге при ишемии, могут способствовать окислительной модификации отдельных аминокислотных остатков в мембранных белках, что будет сопровождаться глубокими изменениями их структурной организации [41]. Результаты нашего исследования показали, что в белках мембран синапсоме при ишемии уровень карбонильных групп на 128% выше по сравнению с контролем (рис. 3). При ишемии, вызванной на фоне гипотермии, уровень карбонильных групп также существенно выше контроля (на 79.6%), но достоверно ниже по сравнению с их уровнем при ишемии. Вместе с тем при ишемии и ишемии на фоне гипотермии в инкубируемых *in vitro* в присутствии оксидантов пробах количество карбонильных групп накапливается значительно меньше по сравнению с контролем. Между кинетическими характеристиками АХЭ и уровнями карбонильных групп обнаружены существенные корреляционные связи. Так,



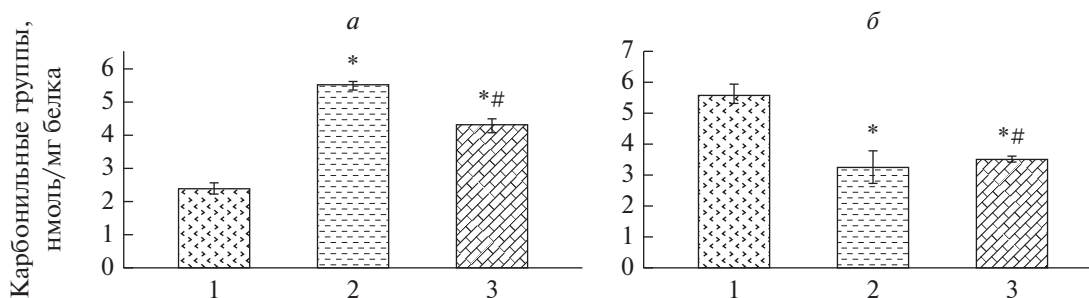


Рис. 3. Содержание карбонильных групп и их прирост за 15 мин в присутствии  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  в белках мембран при ишемии и гипотермии: 1 – контроль, 2 – ишемия, 3 – ишемия + гипотермия ( $n = 10$ ). Достоверные различия: \* – относительно контроля, # – относительно ишемии.

между концентрацией исходных карбонильных групп и значениями  $V_{\max}/K_m$ ,  $K_i$  имеет место отрицательная корреляция ( $r = -0.85$ ,  $p < 0.05$ ), а значениями  $K_i$  – положительная корреляция ( $r = +0.95$ ,  $p < 0.05$ ).

Интенсификация свободнорадикальных процессов при ишемии может быть связана не только с избыточной генерацией АФК и АФА, реакциями окислительной модификации липидов, но и с изменениями в активности компонентов антиоксидантной системы с последующим смещением окислительно-восстановительного баланса клетки в сторону прооксидантов. Анализ СОД выявил трехкратное повышение ее активности в синапсосомах при ишемии (табл. 2). При этом активность КАТ снижается на 58% относительно контроля, что привело к значительному повышению отношения СОД/КАТ. При ишемии на фоне гипотермии активность СОД остается на уровне контроля, а активность каталазы снижается как при ишемии. В результате отношение СОД/КАТ возрастет в меньшей степени, чем при ишемии. При этом между активностью СОД и уровнями МДА обнаружена положительная корреляция ( $r = +0.82$ ,  $p < 0.05$  для исходного уровня и  $r = +0.95$ ,  $p < 0.05$  для индуцированного). Положительная корреляция обнаружена также между активностью СОД, отношением СОД/КАТ и уровнями карбонильных групп ( $r = +0.74$  и  $r = +0.86$ ).

Между кинетическими параметрами АХЭ и активностью антиоксидантных ферментов синапсосом также имеют место высокие уровни корреляции. Так, коэффициенты корреляции

между  $V_{\max}$ ,  $V_{\max}/K_m$ ,  $K_i$  и отношением СОД/КАТ составляют  $-0.9$  ( $p < 0.05$ ),  $-1$  ( $p < 0.05$ ) и  $+1$  ( $p < 0.05$ ) соответственно.

### ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что церебральная ишемия существенно влияет на активность и кинетические характеристики АХЭ мембран синаптических окончаний нейронов. Снижение температуры тела в период окклюзии сонных артерий мозга крыс предотвращает изменение активности и кинетических характеристик фермента.

Обнаруженные разнонаправленные изменения активности АХЭ при ишемии и ишемии–гипотермии обусловлены модуляциями механизмов функционирования фермента, чувствительными индикаторами которых являются кинетические характеристики. Исследование показало, что снижение эффективности катализа АХЭ при ишемии происходит исключительно за счет  $V_{\max}$ , поскольку значения  $K_m$  при этом не изменяются. Известно, что изменение  $V_{\max}$  может происходить за счет изменения концентрации фермента или же его каталитической константы, в соответствии с уравнением:

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E],$$

где  $k_{\text{cat}}$  – каталитическая константа (константа скорости образования продукта реакции),  $[E]$  – концентрация фермента.

Таблица 2. Активность СОД и КАТ в синапсосомах из коры головного мозга крыс при ишемии и гипотермии ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

Состояние животного	СОД, усл. ед./мг белка	КАТ, мкмоль/мин мг белка	СОД/КАТ
Ложная операция	$2.79 \pm 0.16$	$0.99 \pm 0.01$	$2.81 \pm 0.17$
Ишемия 60 мин	$8.36 \pm 0.54^*$	$0.42 \pm 0.02^*$	$19.9 \pm 1.39^*$
Ишемия 60 мин + гипотермия	$2.24 \pm 0.24^\#$	$0.43 \pm 0.03^*$	$5.21 \pm 0.39^*\#$

Примечание: достоверные различия \* – относительно контроля; # – относительно ишемии.

Концентрация фермента в клетке определяется балансом между его биосинтезом и деградацией.

Известно, что АХЭ кодируется одним геном, но может существовать в нескольких молекулярных формах [42]. Соотношения молекулярных форм определяются их тканевым, клеточным и субклеточным распределением и изменяются соответственно развитию или патогенетическому состоянию данных тканей. У позвоночных 3'-конец пре-мРНК АСhЕ альтернативно сплайсирован для генерации трех разных изоформ, которые несут идентичный каталитический домен, но различный С-терминальный конец. В мозге экспрессируются две изформы: тетрамерная АСhЕТ, которая закрепляется на богатый пролином якорь мембраны PRiMA [42], и растворимая мономерная форма АСhЕР, синтез которой активируется при остром физиологическом стрессе в мозге [43].

В работе [24] было установлено, что содержание АХЭ в мозге при ишемии существенно снижается. Поскольку ишемия сопровождается развитием стрессорной реакции, гипотетически она может снизить концентрацию АХЭ в синаптической мембране за счет модуляции альтернативного сплайсинга, в частности, переключения синтеза АСhЕТ на АСhЕР.

Установлено, что при глобальной ишемии существенно подавляется синтез белков в мозге [44], поэтому высказано предположение [24], что снижение содержания АХЭ в мозге при ишемии связано с подавлением экспрессии фермента.

Действительно, при ишемии снижение содержания АХЭ в синаптических мембранах может зависеть и от скорости синтеза фермента. Известно, что АХЭ сначала синтезируется в виде каталитически неактивной молекулы, которая затем быстро созревает в каталитически активную форму. Однако большая часть неактивного фермента остается в этой незрелой форме. Эти молекулы имеют очень короткую продолжительность жизни и разрушаются за счет деградации, связанной с эндоплазматическим ретикуломом с периодом полураспада около 45 минут. Молекулы, созревшие до каталитически активных форм, являются промежуточными между вновь синтезированным каталитически неактивным ферментом и полностью зрелыми и стабильными олигомерными формами. Эти формы способны стабилизироваться прямым взаимодействием с некаталитическими субъединицами PRiMA [45]. Следовательно, экспрессия PRiMA тоже является ключевым фактором в организации G4 АХЭ и нацеливании ее на клеточную мембрану [46]. Однако в нашем случае моделирование ишемии производилось за достаточно короткий промежуток времени (1 ч), что может

оказаться недостаточным для того, чтобы существенно изменить концентрацию АХЭ в синаптической мембране, поскольку период полужизни АХЭ в мозге взрослой крысы составляет  $2.84 \pm 0.13$  дней [47].

Снижение концентрации АХЭ при церебральной ишемии могло происходить, вследствие деградации мембраносвязанного фермента в результате его протеолиза. Известно, что мембранные белки деградируют либо посредством эндолизосомного механизма, либо аутофагии [48, 49]. Гу и сотр. [50] с помощью трансмиссионного электронного микроскопа через 4 часа после ишемического повреждения головного мозга обнаружили в нейронах заметное накопление аутофагических тел и лизосом аутофагии.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при ишемии активность и каталитические характеристики АХЭ коррелируют с уровнем продуктов окислительной модификации белков и липидов мембран синапсом. Это указывает на то, что окислительный стресс может способствовать снижению активности АХЭ при ишемии. Считается, что АФК играет важную роль в развитии окислительного стресса, вызывающего повреждение клеток мозга во время ишемии. АФК в синаптических окончаниях нейронов могут образоваться преимущественно при нарушении дыхательной цепи митохондрий [51], при функционировании моноаминоксидазы [52], а также поступать из активированной микроглии [53].  $O_2^-$ , поступающий из этих источников, конвертируется (преобразовывается) с помощью СОД в  $H_2O_2$ , которая затем превращается в безвредные  $H_2O$  и  $O_2$  под действием КАТ. СОД и КАТ являются ключевыми антиоксидантными ферментами, играющими жизненно важную роль в устранении АФК. Некоторые исследования показали, что активность СОД при церебральной ишемии увеличилась непропорционально изменению активности КАТ [54, 55]. В нашем исследовании также обнаружен существенный дисбаланс в работе этих ферментов в синапсомемах при ишемии. Различия в модуляции активности СОД и КАТ при ишемии могут происходить по различным причинам. Активность СОД увеличивается, вероятно, как реакция на окислительный стресс, вызванный ишемией. Активация СОД во время ишемии может быть компенсаторной реакцией на перепроизводство  $O_2^-$  [56]. Кроме того, повышение уровня интерлейкина-1 (ИЛ-1) [55], фактора некроза опухолей (TNF) и липополисахаридов [57] во время ишемии также может активировать СОД [58]. В отличие от СОД, избыток  $O_2^-$  или  $H_2O_2$  может вызывать повреждения активного центра КАТ, что



приводит к инактивации фермента [59]. Дисбаланс между СОД и КАТ может привести к накоплению чрезмерного количества  $H_2O_2$  в синаптических окончаниях нейронов. По данным микродиализного исследования Лей и др. [60], базальный уровень  $H_2O_2$  в гиппокампе песчанок составлял примерно 1 мкМ. В стриатуме реперфузируемого мозга крыс после ишемического инсульта концентрация  $H_2O_2$  достигала 100 мкМ [61].

Данилович [62] на сарколемме миомерия свиньи показал, что  $H_2O_2$  в физиологических концентрациях (от 1.6 до 6.4 мкМ) способен ингибировать АХЭ. В присутствии дитиотреитола ингибиторный эффект  $H_2O_2$  частично снижался, что, по мнению автора, свидетельствует о вовлеченности тиоловых групп в ингибирование фермента. Накопление  $H_2O_2$  в миллимолярном диапазоне концентраций может снижать экспрессию эпидермальной АХЭ и ингибировать активность рекомбинантной АХЭ человека [63, 64], а также растворимой и мембраносвязанной АХЭ эритроцитов человека [65].

$H_2O_2$  является мягким окислителем, способным окислять тиоловые группы белков, однако в присутствии металлов переменной валентности пероксид водорода может образовать  $\cdot OH$  в реакции Фентона. Было подтверждено, что  $\cdot OH$  ингибирует АХЭ мозга крысы и активность рекомбинантной АХЭ человека [66]. Кинетический анализ с использованием очищенной рекомбинантной АХЭ человека и молекулярное моделирование трехмерной структуры человеческого АХЭ подтвердили, что АФК-опосредованное окисление Trp432, Trp435 и Met436 вызывает перемещение и дезориентацию His440 в активном центре АХЭ и, как результат, дезактивацию белка [63, 64].

Известно, что ПОЛ может изменить физиологические функции клеточных мембран, модифицируя такие свойства мембранного бислоя, как мембранный потенциал, текучесть, проницаемость для различных веществ и/или посттрансляционные химические модификации [67, 68]. При окислительном стрессе изменения в липидной матрице мембраны могут быть решающим фактором в модификации конформационного состояния некоторых молекул, в том числе АХЭ [69]. Хотя уровень ТБКРВ в синапсоммах при ишемии не изменяется, достоверно увеличивается их накопление при генерации радикалов в условиях *in vitro*. Это говорит о повышении доступности жирнокислотных остатков фосфолипидов для окислителей в условиях ишемии из-за нарушений структуры липидного бислоя.

То, что АФК ответственны за ингибирование АХЭ, свидетельствуют данные, полученные при гипотермии. Результаты наших исследований по-

казали, что гипотермия, вызванная во время ишемии, не только предотвращает снижение активности и изменение кинетических характеристик АХЭ, но одновременно снижает уровень продуктов окислительной модификации белков и липидов и дисбаланс антиоксидантных ферментов синапсомом. Ранее Лей и коллеги [70] обнаружили, что гипотермия (30–32°C) снижает ПОЛ в мозге после глобальной ишемии. В последующем было установлено, что умеренная гипотермия, моделируемая во время ишемии, снижает уровни  $NO$  и  $\cdot OH$  после глобальной и фокальной церебральной ишемии [71, 72]. Снижение температуры тела крыс до 33°C при ишемии мозга, вызванной окклюзией среднемозговой артерии, способствовало значительному уменьшению образования супероксид-аниона как в преинфарктной зоне, так и контралатеральной области [73]. Эти данные позволяют с уверенностью предположить, что умеренная гипотермия, снижая генерацию АФК и АФА, предотвращает изменение активности и кинетических характеристик АХЭ мембран синапсомом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе новые данные, во-первых, свидетельствуют, что острая церебральная субтотальная ишемия снижает активность и эффективность катализа АХЭ синаптических мембран мозга крыс, главным образом посредством снижения  $V_{max}$ . Во-вторых, впервые продемонстрировано, что мягкая гипотермия на фоне ишемии предотвращает изменения кинетических констант ( $V_{max}$  и  $K_i$ ), в результате чего эффективность катализа АХЭ сохраняется на уровне контроля. Установлено, что при церебральной ишемии существенно увеличивается уровень маркеров окислительной модификации белков и липидов мембран синапсомом, происходит дисбаланс ключевых антиоксидантных ферментов. Гипотермия на фоне ишемии препятствует развитию окислительного стресса в синапсоммах. Полученные результаты вносят вклад в понимание участия АФК в модуляции активности синаптической АХЭ при ишемии мозга и путей защиты фермента при умеренной гипотермии.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена без внешней финансовой поддержки.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

*Конфликт интересов.* Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

*Этическое одобрение.* Все применимые международные, национальные и (или) институциональные

принципы ухода и использования животных, нормы и правила выполнения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных (Директива 2010/63/EU Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях) были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lin L, Wang X, Yu Z.* // *Biochem. Pharmacol.* 2016. V. 5. № 4. <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000213>
2. *Awooda H.A.* // *J. Biosci. Med.* 2019. V. 7. P. 20–28.
3. *Chan P.H.* // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001. V. 21. P. 2–14.
4. *Sayre L.M., Perry G., Smith M.A.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2008. V. 21. № 1. P. 172–188.
5. *Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007. V. 39. P. 44–84.
6. *Awooda H.A., Lutfi M.F., Saeed A.M.* // *Int. J. Health Sci.* 2015. V. 9. P. 17–24.
7. *Chen H., Yoshioka H., Kim G.S., Jung J.E., Okami N., Sakata H., Chan P.H.* // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. V. 14. № 8. P. 1505–1517.
8. *Sun M.S., Jin H., Sun X., Huang S., Zhang F.L., Guo Z.N., Yang, Y.* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3804979>
9. *van der Worp H.B., Macleod M.R., Kollmar R.* // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2010. V. 30. P. 1079–1093.
10. *Olsen T.S., Weber U.J., Kammergaard L.P.* // *The Lancet Neurology.* 2003. V. 2. № 7. P. 410–416.
11. *Sun Y.-J., Zhang Z.-Y., Fan B., Li G.-Y.* // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. Article 586. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00586>
12. *Schliebs R., Arendt T.* // *J. Neural Transm.* 2006. V. 113. № 11. P. 1625–1644.
13. *Solari N., Hangya B.* // *Eur. J. Neurosci.* 2018. V. 48. № 5. P. 2199–2230.
14. *Taylor P.* // *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics* / Ed.: *Brunton L.* N.Y.: McGraw-Hill, 2006. P. 201–217.
15. *Orta-Salazar E., Cuellar-Lemus C.A., Díaz-Cintra S., Fera-Velasco A.I.* // *Neurología.* 2014. V. 29. № 8. P. 497–503.
16. *Hicks D., John D., Makova N.Z., Henderson Z., Nalivaeva N.N., Turner A.J.* // *J. Neurochem.* 2011. V. 116. № 5. P. 742–746.
17. *Zimmerman G., Soreq H.* // *Cell Tiss. Res.* 2006. V. 326. № 2. P. 655–669.
18. *Thullbery M.D., Cox H.D., Schule T., Thompson C.M., George K.M.* // *J. Cell Biochem.* 2005. V. 96. № 3. P. 599–610.
19. *Sakuma M., Hyakawa N., Kato H., Araki T.* // *J. Neural Trans.* 2008. V. 115. № 3. P. 413–422.
20. *Katsuki H., Matsumoto K.* // *Nicotinic acetylcholine receptor signaling in neuroprotection* / Ed.: *Akaike A., Shimohama S., Misu Y.* Singapore: Springer, 2018. P. 113–136.
21. *Kataoka K., Hayakawa T., Kuroda R., Yuguchi T., Yamada K.* // *Stroke.* 1991. V. 22. P. 1291–1296.
22. *Beley A., Bertrand N., Beley P.* // *Neurochem. Res.* 1991. V. 16. № 5. P. 555–561.
23. *Malatová Z., Gottlieb M., Marsala J.* // *Gen. Physiol. Biophys.* 1999. V. 18. № 1. P. 57–71.
24. *Saez-Valero J., Gonzalez-Garcia C., Cena V.* // *Mol. Brain Res.* 2003. V. 117. P. 240–244.
25. *Мохаммед М.Т., Кличханов Н.К.* // *Изв. Даг. гос. пед. ун-та. Естеств. и точн. науки.* 2010. № 2. С. 69–73.
26. *Ojo O.B., Amoo Z.A., Saliu I.O., Olaleye M.T., Farombi E.O., Akinmoladun A.C.* // *Biomed. Pharmacother.* 2019. V. 111. P. 859–872.
27. *Wang Z.-F., Wang J., Zhang H.Y., Tang X.C.* // *J. Neurochem.* 2008. V. 106. P. 1594–1603.
28. *Deb B., Sreenath C., Kumar M.S., Elango K.* // *J. Appl. Pharm. Sci.* 2012. V. 2. № 3. P. 106–111.
29. *Hu T., Fu Q., Liu X., Zhang H., Dong M.* // *J. Neuroimmunol.* 2009. V. 211. P. 84–91.
30. *Lapetina E.G., Soto E.F., De Robertis E.* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1967. V. 135. P. 33–43.
31. *Lowry D.H., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall R.J.* // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
32. *Ellman Y.L., Courtney K.D., Andres V.J., Featherstone R.M.* // *Biochem. Pharmacol.* 1961. V. 7. № 1. P. 88–95.
33. *Stojan J., Brochier L., Alies C., Colletier J.P., Fournier D.* // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 1364–1371.
34. *Reed M.C., Lieb A., Nijhout H.F.* // *Bioessays.* 2010. V. 32. P. 422–429.
35. *Rosenberry T.L.* // *J. Mol. Neurosci.* 2010. V. 40. P. 32–39.
36. *Putz M.V.* // *Molecules.* 2011. V.16. P. 3128–3145.
37. *Лысакова Т.И., Аксентьев С.Л., Федорович С.В., Левко А.В., Ракович А.А., Самойленко С.Г., Федулов А.С., Конев С.В.* // *Биофизика.* 1997. Т. 42. Вып. 2. С. 408–411.
38. *Venditti P., Rosa R.D., Meo S.D.* // *Free Rad. Biol. Med.* 2004. V. 36. № 3. P. 348–358.
39. *Сирота Т.В.* // *Биомед. химия.* 2013. Т. 59. № 4. С. 399–410.
40. *Aebi H.* // *Methods of Enzymatic Analysis.* Academic Press. 1974. P. 673–684.
41. *Дубинина Е.Е.* // *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. Жизнь и смерть, созидание и разрушение: монография.* С.-Петербург, 2006. 400 с.
42. *Massoulié J.* // *Neurosignals.* 2002. V. 11. P. 130–143.
43. *Meshorer E., Soreq H.* // *Trends Neurosci.* 2006. V. 29. № 4. P. 216–224.
44. *Bodsch W., Takahashi K., Barbier A., Ophoff B.G., Hossman K.A.* // *Prog. Brain Res.* 1985. V. 63. P. 197–210.
45. *Rotundo R.L.* // *J. Neurochem.* 2017. V. 142. P. 52–58.
46. *Chen V.P., Choi R.C., Chan W.K., Leung K.W., Guo A.J., Chan G.K., Tsim, K.W.* // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 38. P. 32948–32961.
47. *Wenthold R.J., Mahler H.R., Moore, W.J.* // *J. Neurochem.* 1974. V. 22. № 6. P. 941–943.
48. *Huber L.A., Teis D.* // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2016. V. 39. P. 8–14.
49. *Galluzzi L., Baehrecke E.H., Ballabio A., Boya P., Bravo-San Pedro J.M., Cecconi F., Kroemer G.* // *EMBO J.* 2017. V. 36. № 13. P. 1811–1836.
50. *Gu Z., Sun Y., Liu K., Wang F., Zhang T., Li Q., Sun X.* // *Neural Reg. Res.* 2013. V. 8. № 23. P. 2117–2125.
51. *Starkov A. A., Chinopoulos C., Fiskum G.* // *Cell Calcium.* 2004. V. 36. № 3–4. P. 257–264.

52. *Seif-El-Nasr M., Atia A.S., Abdelsalam R.M.* // *Arzneimittelforschung*. 2008. V. 58. № 4. P. 160–167.
53. *Weinstein J.R., Koerner I.P., Möller T.* // *Future Neurol*. 2010. V. 5. № 2. P. 227–246.
54. *Işlekel S., Işlekel H., Güner G., Özdamar N.* // *Res. Exp. Med*. 1999. V. 199. № 3. P. 167–176.
55. *Девятов А.А., Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Рыжков И.Н., Ругер Н.А., Тутельян В.А.* // *Биомед. химия*. 2018. V. 64. № 4. P. 344–348.
56. *Maier C.M., Sun G.H., Cheng D., Yenari M.A., Chan P.H., Steinberg G.K.* // *Neurobiol. Dis*. 2002. V. 11. № 1. P. 28–42.
57. *Al-Amin M.M., Choudhury M.F.R., Chowdhury A.S., Chowdhury T.R., Jain P., Kazi M., Alkholief M., Alshehri S.M., Reza H.M.* // *Front. Neurosci*. 2018. V. 12. P. 384.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00384>
58. *Marikovsky M., Ziv V., Nevo N., Harris-Cerruti C., Mahler O.* // *J. Immunol*. 2003. 170. № 6. P. 2993–3001.
59. *Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D., Michiels C., Raes M., Remacle J.* // *Mech. Ageing Dev*. 1990. V. 51. № 3. P. 283–297.
60. *Lei B., Adachi N., Arai T.* // *Brain Res. Prot*. 1998. V. 3. № 1. P. 33–36.
61. *Hyslop P.A., Zhang Z., Pearson D.V., Phebus L.A.* // *Brain Res*. 1995. V. 671. P. 181–186.
62. *Danylovykh Iu.V.* // *Ukr. Biokhim. Zh*. 2009. V. 81. № 4. P. 32–38.
63. *Schallreuter K.U., Elwary S.M.A., Gibbons N.C.J., Rokos H., Wood J.M.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004. V. 315. № 2. P. 502–508.
64. *Schallreuter K.U., Elwary S.* // *Life Sci*. 2007. V. 80. № 24–25. P. 2221–2226.
65. *Молочкина Е.М., Озерова И.Б.* // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2003. Т. 43. № 3. С. 294–300.
66. *Méndez-Garrido A., Hernández-Rodríguez M., Zamora-Ulloa R., Correa-Basurto J., Mendieta-Wejbe J.E., Ramírez-Rosales D., Rosales-Hernández M.C.* // *Neurochem. Res*. 2014. V. 39. № 11. P. 2093–2104.
67. *Catalá A., Díaz M.* // *Front. Physiol*. 2016. V. 7. P. 423.  
[doi.org/https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00423](https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00423)
68. *Gaschler M.M., Stockwell B.R.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2017. V. 482. № 3. P. 419–425.
69. *Gonçalves J.F., Fiorenza A.M., Spanevello R.M., Mazzanti C.M., Bochi G.V., Antes F.G., Schetinger M.R.C.* // *Chem.-Biol. Interact*. 2010. 186. № 1. P. 53–60.
70. *Lei B., Tan X., Cai H., Xu Q., Guo Q.* // *Stroke*. 1994. V. 25. P. 147–152.
71. *Kil H.Y., Zhang J., Piantadosi C.A.* // *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1996. V. 16. P. 100–106.
72. *Kumura E., Yoshimine T., Takaoka M., Hayakawa T., Shiga T., Kosaka H.* // *Neurosci. Lett*. 1996. V. 220. P. 45–48.
73. *Maier C.M., Sun G.H., Cheng D., Yenari M.A., Chan P.H., Steinberg G.K.* // *Neurobiol. Dis*. 2002. V. 11. № 1. P. 28–42.

## Effect of Mild Hypothermia on the Catalytic Characteristics of Synaptic Acetylcholinesterase during Incomplete Global Cerebral Ischemia in Rats

N. K. Klichkhanov<sup>a</sup> and A. M. Dzhafarova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Daghestan State University, Makhachkala, Russia

Acute cerebral ischemia initiates a cascade of reactions that can result in the development of oxidative stress and disruption of the balanced functioning of a number of neurotransmitter systems in the brain. The protective effects of therapeutic hypothermia in ischemia are well known and studied, however, the mechanisms of its effect on the cholinergic system of the brain, closely related to the functioning of acetylcholinesterase (AChE), remain unclear. In this work, the activity and kinetic parameters of AChE, as well as the relationship between the catalytic properties of the enzyme and the intensity of free radical processes in the synaptic terminals of neurons in the rat brain with occlusion of the carotid arteries in conditions of normothermia and moderate (33°C) hypothermia were investigated. It was found that cerebral ischemia leads to a decrease in AChE activity, while hypothermia during the period of carotid artery occlusion prevents this. In cerebral ischemia, the  $V_{\max}$  value and the efficiency of AChE catalysis decrease, and  $K_i$  increases. This against the background of unchanged  $K_m$  values contributes to an increase in the range of effective acetylthiocholine concentrations and  $[S]_{\text{opt}}$  values. Mild hypothermia against the background of cerebral ischemia prevents significant changes in the kinetic parameters of the enzyme. Ischemia stimulates the processes of oxidative destruction of membrane proteins and lipids, significantly increases the superoxide dismutase (SOD) activity and the SOD/catalase ratio in synaptosomes. Hypothermia during ischemia prevents an increase in level of lipid and protein oxidative modification products, as well as superoxide dismutase activity in synaptosomes. A negative correlation was found between the kinetic parameters of AChE and the levels of products of oxidative modification of lipids and proteins of synaptosomes. This indicates an important role of reactive oxygen species in modulating the activity of a key enzyme of the cholinergic system. The results obtained allow us to conclude that hypothermia during ischemia prevents the activation of free radical processes in the synaptic endings of neurons, which, in turn, prevents a decrease in the activity and efficiency of AChE catalysis.

*Keywords:* subtotal ischemia, hypothermia, brain, synaptic membranes, AChE, kinetic parameters, malondialdehyde, carbonyl groups, superoxide dismutase, catalase