

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА АКТИВНОСТЬ Na, K-АТФАЗЫ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН МОЗГА КРЫС

THE EFFECT OF HYPOTHERMIA ON THE ACTIVITY OF Na, K-ATPASE OF SYNAPTIC MEMBRANES OF RAT BRAIN

G. Guseynov

Summary. The effect of moderate (30 °C) and deep (20 °C) short-term hypothermia and reduced glutathione on the activity of Na, K-ATPase of the synaptic membranes from rat brain has been investigated. The content of SH-groups and the S-S-bonds in synaptosomal membrane proteins under hypothermia has also been studied. Hypothermia reduces the activity of synaptosomal membrane Na, K-ATPase. Inhibition of the enzyme depends on the depth of hypothermia. In the in vitro condition the incubation of the suspension of synaptosomes with the reduced glutathione does not affect on the activity of Na, K-ATPase in control, but increases the activity of the enzyme under hypothermia. At hypothermia the oxidation of the thiol groups of synaptosomal membrane proteins occurs, which correlates with the degree of inhibition of Na, K-ATPase. Possible mechanisms of inhibition of the enzyme at hypothermia are discussed.

Keywords: hypothermia; rats; proteins of the brain.

Гусейнов Герман Омарович

Доцент, ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
germ.67@mail.ru

Аннотация. Изучено воздействие умеренной (30°C) и глубокой (20°C) кратковременной гипотермии и восстановленного глутатиона на активность Na, K-АТФазы синаптических мембран из мозга крыс. Определено ещё и содержание SH-групп и S-S-связей в белках мембран синапсом во время гипотермии. Гипотермия уменьшает активность Na, K-АТФазы мембран синапсом. Уровень ингибирования фермента находится в зависимости от глубины гипотермии. В условиях in vitro инкубирование суспензии синапсом с восстановленным глутатионом не воздействует на активность Na, K-АТФазы в контроле, но повышает активность фермента во время гипотермии. В условиях гипотермии осуществляется окисление тиоловых групп белков мембран синапсом, что коррелирует со степенью ингибирования Na, K-АТФазы. Обсуждаются вероятные механизмы ингибирования фермента во время гипотермии.

Ключевые слова: гипотермия; крысы; белки мозга.

Na, K-АТФаза — встроенный в плазматическую мембрану натриевый насос, функционирующий против градиентов с целью поддержания асимметричного распределения калия и натрия [1]. Градиенты ионов калия и натрия, создаваемые Na, K-АТФазой, выступают физической базой электрической активности нейронов, обеспечивают осмотический баланс в системе нейрон — экстраклеточный компартмент, используются для транспортировки аминокислот, нейромедиаторов [2, 3]. В связи с частыми возмущениями ионного гомеостаза в ходе постоянной активности нейронов нагрузка Na, K-АТФазы настолько значительна, что она потребляет практически половину АТФ в головном мозге [4]. Na, K-АТФаза выступает гетеродимером, составленным из двух субъединиц: каталитической α -субъединицы, обладающей АТФазной активностью, и β -субъединицы, нужной для ферментативной активности Na, K-АТФазы [5]. Сейчас у позвоночных выявлены изоформы α -субъединицы ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ и $\alpha 4$) и 3 изоформы β -субъединицы ($\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 3$) Na, K-АТФазы [6], кодируемые различными генами. В мозге экспрессируются $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ изоформы. При этом $\alpha 3$ изоформа (отличается более значительным сродством к АТФ) находится в нейронах, а $\alpha 2$ изоформа — в глиальных клетках [7, 8]. α -Изоформы имеют в своем составе довольно

значительное число цистеиновых остатков, многие из которых оказываются доступными для окислителей. В связи с этим Na, K-АТФаза выступает мишенью для активных форм кислорода, которые, за счёт осуществления обратимого окисления тиоловых групп, призваны обеспечить редокс-зависимую регуляцию активности фермента [9].

Мы изучили воздействие глубокой гипотермии (20°C) на различные кинетические характеристики Na, K-АТФазы синаптических мембран из коры головного мозга крыс [3]. Было выявлено, что гипотермия сокращает K_m и V_m и повышает сродство фермента к строфантину К. Предположили, что изменения в кинетических свойствах Na, K-АТФазы частично связываются с окислительной модификацией непосредственного фермента или его липидного микроокружения, т.к. было определено, что на начальных этапах гипотермия способна стимулировать свободнорадикальные процессы в мозге [5]. Мы изучили вероятное участие свободнорадикальных процессов в ингибировании Na, K-АТФазы мембран синапсом из коры головного мозга крыс во время гипотермии.

Опыты были проведены на белых беспородных крысах-самцах, имеющих массу 180–200 г. Гипотер-

Содержание SH-групп и S-S-связей (нмоль/мг белка) и их соотношение в белках мембран синапсом коры головного мозга крыс в случае гипотермии ($M \pm m$; $n = 8$)

Группа животных	SH-группы	S-S-связи	Окислительный индекс (S-S/SH)
Контроль	145.9±2.6	35.23±2.76	0.24
Гипотермия 30 °С	106.6±3.8 p<0.001	51.21± 0.79 p<0.02	0.48
Гипотермия 20 °С	113.1±2.5 p<0.001	61.30± 2.99 p<0.01	0.54

Примечание: p — достоверность различий относительно контроля

мию вызывали в холодových камерах. Температуру тела животных снижали до 30°C (считается умеренной гипотермией) и 20°C (считается глубокой гипотермией) со скоростью 0.28°C/мин равномерно. Из коры больших полушарий с помощью метода низкоскоростного центрифугирования [4] выделяли синапсомы. При этом мембраны синапсомы выделяли после гипоосмотического шока, оставляли на хранение в морозильнике при -20°C и использовали на очередные сутки. Активность Na, K-АТФазы определяли в виде разности между общей и Mg 2+-зависимой АТФазной активностью. Среда для выяснения общей АТФазы содержала (в мМ/л): NaCl — 130, KCl — 20, MgCl₂-3, АТФ — 3, трис-HCl буфер (pH 7.4) — 30. Содержание мембранного белка в пробе — 40 мкг. Во время определения активности Mg 2+-АТФазы среда инкубации помимо указанных элементов содержала также ингибитор Na, K-АТФазы — убаин в концентрации 1 мМ. Об активности фермента можно было судить по величине прироста количества неорганического фосфора (Pn) [1] и выражали в мкмольх Pn на 1 мг белка за 1 час.

При изучении воздействия глутатиона на активность Na, K-АТФазы к 0.2 мл суспензии мембран синапсом (с содержанием белка 1.5 мг/мл) добавляли дополнительно 0.2 мл 0.2 мМ раствора, восстановленного глутатиона (конечная концентрация 100 мкмоль), сделанного на 50 мМтрис-HCl буфере (pH 7.4). В контрольную пробу добавили 0.2 мл 50 мМтрис-HCl буфера. Суспензии инкубировали на протяжении 10 минут при 4°C, затем смесь разбавляли 22 раза средой, в которой осуществляли измерение активности выбранного фермента (NaCl 130 мМ, KCl 20 мМ, MgATФ 3 мМ, трис-HCl 50 мМ, pH 7.4 при 37°C).

Содержание восстановленных тиоловых групп в белках мембран синапсом выясняли с помощью методики амперометрического титрования с применением азотнокислого серебра [5], а дисульфидных связей — методом обратного титрования [6]. Содержание белка выясняли по методу Лоури с сотр. [7]. В каждой серии экспериментов использовали 5–8 животных. Сведения подвергали статистической обработке, достоверность различий средних выясняли с использованием критерия Стьюдента [8].

Уменьшение температуры тела крыс ведёт к ингибированию фермента. Активность фермента уменьшается при умеренной гипотермии на 19%, а при глубокой гипотермии — на 50% относительно контроля. Итак, степень торможения Na, K-АТФазы находится в зависимости от глубины гипотермии.

Каковы же причины уменьшения активности Na, K-АТФазы мозга во время гипотермии? На активность Na-насоса способны воздействовать разные факторы, в том числе химический состав липидного окружения, взаимодействие с остальными мембранными белками и цитоскелетом, химическая модификация [9]. Определено, что в условиях окислительного стресса, который бывает на начальных стадиях гипотермии [2], осуществляется ингибирование Na, K-АТФазы и разобщение гидролиза АТФ с активным транспортом ионов [2]. В то же время реакция фермента на окислительный стресс находится в зависимости от вида свободного радикала (H₂O₂, O₂, OH, GS или ONOO) и состава изоформ α-субъединицы [1]. Сопоставление чувствительности к окислению Na, K-АТФазы из почек, содержащей лишь α1-субъединицу, и из мозга, содержащей ещё и α2- и α3-субъединицы, продемонстрировало, что α1-изоформа является более устойчивой к окислительной модификации, при этом α2 и α3 значительно легче теряют собственную активность во время окисления [2]. Из-за того, что различные изоформы Na, K-АТФазы несущественно различаются по количеству остатков цистеина, включённых в их состав (23 в α1, 24 α2 и 24–25 в α3), более значительную чувствительность фермента из мозга к окислению в сравнении с ферментом из почек можно связать с разницей не только в их числе, но и в местоположении (экспонированности) [2].

О вероятности окислительной модификации мембранных белков синапсом, в том числе и Na, K-АТФазы, мы рассуждали на основе количества SH-групп и S-S-связей в них, которые определяются амперометрическим титрованием. Как можно увидеть из таблицы, при умеренной гипотермии в белках синаптических мембран на 26.9% уменьшается количество титруемых SH-групп. Число тиоловых групп в мембранных белках остаётся уменьшенным и в случае глубокой гипотермии. При

этом число дисульфидных связей в белках синаптических мембран увеличивается параллельно уменьшению температуры тела. В соответствии с этим в два раза увеличивается соотношение S-S/SH, обозначаемое в виде окислительного индекса, считающегося одним из критериев окислительной (в основном под влиянием свободных радикалов) модификации мембранных белков [3].

Считается, что модификация SH-групп мембранных белков ведёт к значительному росту ионной проницаемости мембран [4]. Это, в то же время, нарушает осмотическое равновесие, что в рамках гипотермии ведёт к отеку клеток мозга [5]. Помимо этого, окисление SH-групп в активном центре ионных насосов (кальциевого и натриевого) инактивирует данные белки и нарушает ионный гомеостаз клетки, что способно усилить клеточный отек.

Необходимо отметить, что в случае гипотермии между активностью Na, K-АТФазы и содержанием дисульфидных связей в мембранных белках и их окислительным индексом есть линейная зависимость. Это говорит о том, что ингибирование Na, K-АТФазы в случае гипотермии в некоторой мере связывается с окислительной модификацией тиоловых групп фермента под влиянием оксидантов.

Для того чтобы определить связь между уменьшением активности Na, K-АТФазы и окислительной модификацией важных тиоловых групп фермента, мы инкубировали суспензию мембран синапсом с восстановленным глутатионом — ключевым клеточным антиоксидантом. До этого было продемонстрировано, что добавление

в среду с Na, K-АТФазой аскорбата, дитиотреитола или цистеина после окислительной модификации ведёт к восстановлению и начального числа SH-групп, и активности фермента [6]. Добавление глутатиона (100 мкМ) к суспензии мембран из мозга контрольных животных не воздействует на проявление активности со стороны фермента. При этом у животных с температурой тела 20°C под влиянием глутатиона достоверно увеличивается активность Na, K-АТФазы. Увеличение активности фермента в данной ситуации составляет 26% по отношению к пробе без глутатиона. Соответственно, уменьшение активности Na, K-АТФазы мембран синапсом при глубокой гипотермии обусловлено окислительной модификацией тиоловых групп фермента.

Необходимо отметить, что во время гипотермии глутатион целиком не восстанавливает активность фермента. Это говорит о том, что ингибирование активности Na, K-АТФазы в случае гипотермии обусловлено не только окислительной модификацией тиоловых групп фермента. Есть вероятность, что ингибирование активности фермента в случае гипотермии осуществляется не только под влиянием АФК, но ещё и в ходе окислительной модификации его липидного микроокружения и накопления продуктов их деградации, динамики редокс-состояния окружения, фосфорилирования субъединиц [7].

Итак, полученные нами сведения говорят о том, что гипотермия помогает ингибированию Na, K-АТФазы мембран синапсом из коры головного мозга крыс. Одной из возможных причин ингибирования фермента считается окисление тиоловых групп молекулы белка под влиянием оксидантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rai, N. K. Exposure to As, Cd and Pb mixture impairs myelin and axon development in rat brain, optic nerve and retina / N. K. Rai, A. Ashok, A. Rai et. al. // *J. Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 2013. — V. 273(2). — P. 242–58.
2. Gerspacher, C. The effect of cadmium on brain cells in culture / C. Gerspacher, U. Scheuber, G. Schiera et. al. // *Int. J. Mol. Med.* — 2009. — V. 24(3). — P. 311–318.
3. Sarchielli, E. Cadmium induces alterations in the human spinal cord morphogenesis / E. Sarchielli, S. Pacini, G. Morucci et. al. // *Biomaterials.* — 2012. — V. 25(1). — P. 63–74.
4. Unno, K. Acute enhancement of nonrapid eye movement sleep in rats after drinking water contaminated with cadmiumchloride / K. Unno, K. Yamoto, K. Takeuchi et. al. // *J. Appl. Toxicol.* — 2014. — V. 34(2). — P. 205–213.
5. Sofroniew, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation / M. V. Sofroniew // *Trends. Neurosci.* — 2009. — V. 32(12). — P. 638–647.
6. Yang, C. S. Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium / C. S. Yang, B. C. Tzou, Y. P. Liu et. al. // *J. Cell. Biochem.* — 2008. — V. 103(3). — P. 825–34.
7. Rai, A. Down-regulated GFAP: a major player in heavy metal induced astrocyte damage / A. Rai, S. K. Maurya, R. Sharma et. al. // *Toxicol. Mech. Methods.* — 2013. — V. 23(2). — P. 99–107.
8. Влияние низких доз ионов Pb²⁺ на состояние цитоскелета астроцитов мозга крыс в раннем постнатальном периоде / Е. В. Сухаренко, И. В. Прищепа, В. С. Недзвецкий, В. И. Максимов // *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные* — 2015. — № 2. — С. 10–13.
9. Notarachille, G. Heavy metals toxicity: effect of cadmium ions on amyloid beta protein 1–42. Possible implications for Alzheimer's disease / G. Notarachille, F. Arnesano, V. Calo et. al. // *Biomaterials.* — 2014. — V. 27(2). — P. 371–388.