



УДК 616—036.882--08—07

АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНАЯ СИСТЕМА ТКАНИ ГОЛОВНОГО
МОЗГА ПРИ КЛИНИЧЕСКОЙ СМЕРТИ И В
ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ.

ПЫЛОВА С. И.

Институт общей реаниматологии АМН СССР, Москва

Исследовано содержание сАМР и активность аденилатциклазы (АЦ) в ткани серого вещества и стриарной системы головного мозга собак при системной остановке кровообращения вследствие электротравмы длительностью 1—2 мин, 15 мин и в постреанимационном периоде у животных, перенесших 15 мин клиническую смерть.

Установлено, что в период остановки системного кровообращения в исследуемых областях мозга резкая активация АЦ приводит к значительному увеличению уровня сАМР. Норадrenalин (НА), серотонин (5-ОТ) активировали АЦ ткани серого вещества и стриатума головного мозга контрольных и опытных животных при 1—2 мин полной ишемии. В период 15 мин остановки кровообращения НА-стимулированная активность АЦ в коре мозга была ниже, а в стриатуме значительно выше базального уровня. 5-ОТ не оказывал активирующего эффекта на АЦ исследуемых областей мозга животных. Дофамин (ДА) вызывал увеличение активности АЦ стриатума как интактных животных, так и животных в период 1—2 и 15 мин клинической смерти.

В постреанимационном периоде (на 2—5 сутки) у животных с разной степенью восстановления неврологического статуса изменения метаболизма сАМР не нормализуются. Значительно снижено содержание сАМР в тканях мозга. Выявлен разнонаправленный характер изменений активности АЦ и фосфодиэстеразы (ФДЭ): в коре активность ферментов ниже, а в стриатуме достоверно выше контрольных значений. ДА, 5-ОТ, НА не оказывали активирующего эффекта на АЦ мозга животных в постреанимационном периоде. Показано, что степень метаболических изменений зависит от полноты восстановления неврологического статуса.

Выяснение механизмов гипоксической и постгипоксической патологии мозга на уровне тканевого метаболизма является одной из важнейших проблем современной экспериментальной и клинической реаниматологии [1]. Согласно современным представлениям аденилатциклазная система, сопряженная с рецепторами, является ведущим звеном в процессах трансформации сигнала, передаваемого гормонами и нейромедиаторами. Важная роль аденилатциклазного комплекса в функциональной активности ЦНС, в регуляции психических состояний позволяет предположить ее участие в механизмах постреанимационной патологии мозга.

Данная работа была предпринята с целью исследования содержания сАМР и активности аденилатциклазы (АЦ) в ткани серого вещества и стриатума головного мозга у собак при клинической смерти, вызванной остановкой системного кровообращения вследствие электротравмы и в постренимационном периоде.

Материалы и методы

Острые и хронические опыты выполнены на 30 беспородных наркотизированных (промедол 6—8 мг/кг) собаках обоего пола массой 12—19 кг. Моделью терминального состояния служила клиническая смерть вследствие фибрилляции желудочков сердца, вызванная электротравмой. Ткань серого вещества (теменной области) и стриатума головного мозга изолировали под тиопенталовым наркозом (15—25 мг/кг) после операции децеребрации у интактных животных контрольной группы, в различные периоды остановки кровообращения 1—2, 15 мин, а также в постренимационном периоде (на 2—5 сутки) у собак, перенесших 15-минутную клиническую смерть. Ткань мозга помещали в жидкий азот. Восстановление функций ЦНС в постренимационном периоде оценивали по состоянию и поведению животных (включая позу, координацию движений, реакции на слуховые, зрительные и другие раздражители, прием пищи, состояние кожных и слизистых покровов и пр.), используя шкалу неврологического дефицита [2].

Активность АЦ измеряли в мембранных препаратах, полученных при центрифугировании (40000 g) гомогенатов ткани мозга (среда выделения 10 мМ трис-НСl; 0,32 М сахара рН 7,4; 2 мМ ЭГТА). Измерение активности АЦ проводили при 37°, 15 мин в 50 мкл среды, содержащей 50 мМ трис, рН 7,5; 5 мМ MgCl₂; 0,1 мМ GTP; 1 мМ сАМР; 0,5 мМ изобутилметилксантин; 0,1 мМ (³²P)сАМР (2×10⁶ с.р. на пробу); 20 мМ креатинфосфат; 0,2 мг/мл креатинкиназы. Реакцию инициировали внесением мембранного препарата фермента, а останавливали добавлением 0,2 мл 0,5 М НСl. Затем пробы кипятили в водяной бане 7 мин и добавляли 0,2 мл 1,5 М имидазола. Количество образовавшейся [³²P]сАМР определяли по методу White [3]. С целью сравнительного изучения стимуляции активности АЦ использовали ДА, 5-ОТ, НА в концентрации 10⁻⁵ М. Уровень сАМР в экстрактах ткани мозга определяли радионуклеотидным методом конкурентного связывания с белком, используя наборы фирмы «Amersham» (Англия). Статистическую обработку результатов проводили с применением критерия Вилкоксона (р) [4].

Результаты исследования

Установлено, что на 1—2-й мин остановки системного кровообращения в ткани серого вещества головного мозга и стриатума уровень сАМР возрастал более чем на 250%, на 15 мин—на 150% по сравнению с контролем (р<0,01) (рис. 1). Определение базальной активности

АЦ в исследуемых тканях выявило ее резкую активацию—на первых минутах полной ишемии активность фермента возрастала более чем в 5 раз, в последующий период (15 мин) она снижалась, оставаясь достоверно выше контрольного ($p < 0.01$) (таблица).

Повышение содержания сАМР в период клинической смерти, вероятно, связано с быстрым и значительным высвобождением катехоламинов и других биологически активных соединений, активирующих АЦ и стимулирующих продукцию циклических нуклеотидов [5]. Активирующий эффект на АЦ оказывают и процессы протеолиза, а также изменения физико-химических свойств белков типа денатурационных, развивающиеся при системной остановке кровообращения [6].

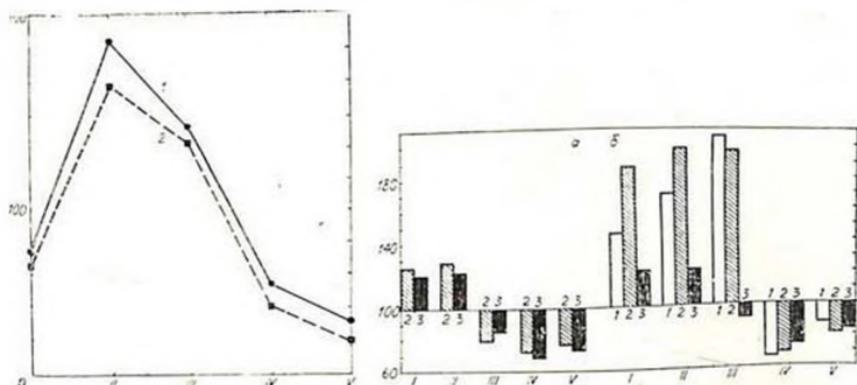


Рис. 1. Содержание сАМР (нмоль/г ткани) в коре (1) и стриатуме (2) головного мозга при остановке кровообращения от электротравмы и в постреанимационном периоде. I—контрольные животные, II—1—2 мин остановки кровообращения, III—15 мин остановки кровообращения, IV—неврологический дефицит (9—12 баллов), постреанимационный период (2—5 суток); V—неврологический дефицит (28—30 баллов), постреанимационный период (2—5 суток)

Рис. 2. Влияние биологически активных веществ на активность аденилатциклазы коры (а) и стриатума (б) мозга собак. I—контрольные животные, II—1—2 мин остановки кровообращения, III—15 мин остановки кровообращения, IV—неврологический дефицит (9—12 баллов). 1—дофамин, 2—норадреналин, 3—серотонин. Базальная активность аденилатциклазы при всех функциональных состояниях принята за 100%. Аденилатциклаза коры (теменная область) мозга не чувствительна к дофамину

НА и 5-ОТ достоверно активировали АЦ серого вещества и стриатума головного мозга контрольных и опытных животных при 1—2 мин ишемии (рис. 2). При удлинении срока клинической смерти до 15 мин реакция АЦ на стимуляцию биогенными аминами в значительной степени изменялась. Активирующий эффект НА не выявлялся, НА-стимулируемая активность АЦ снижалась на 20% по сравнению с базальной ($p < 0.05$). С этим согласуются результаты определения базальной и НА-стимулированной активности АЦ в срезах головного мозга крыс, подвергнутых электрошоку [7]. В стриатуме НА вызывал двукратное

увеличение активности фермента, а 5-ОТ не оказывал активирующего эффекта на АЦ тканей исследуемых областей мозга животных. Учетываемая нейромедиаторную роль ДА в стриатуме, при анализе аденилатциклазной системы в этой ткани особого внимания заслуживает изменение эффектов ДА. У контрольных животных ДА активировал АЦ более чем на 40% ($p < 0,01$), а при клинической смерти ДА-стимулирующий эффект усиливался. Активность АЦ также возрастала более чем в 2 раза.

Таблица

Активность аденилатциклазы (в пмоль/мг белка/мин) в коре и стриатуме головного мозга собак при остановке кровообращения и в пострестимуляционном периоде (2—5 сут.)

Область	Контроль	Длительность остановки кровообращения		Пострестимуляционный период Неврологический дефицит в баллах	
		1—2 мин	15 мин	28—30	9—12
Кора	64,0 ±3,0	292,0* ±12,0	200,0* ±10,0	29,0* ±2,0	42,0* ±3,0
Стриатум	36,0 ±4,0	258,0* ±9,0	160,0* ±7,0	93,0* ±5,0	70,0* ±6,0

* достоверность различий по отношению к контролю $p < 0,01$

На 2—5 сутки пострестимуляционного периода у животных, перенесших 15-минутную остановку кровообращения, степень восстановления неврологического статуса была различной. У животных с неврологическим дефицитом (28—30 баллов, группа А) в значительной степени нарушено сознание, отсутствовали или были слабо выражены зрительные, слуховые реакции (по используемой шкале неврологического дефицита 100 баллов—летальность, 50 баллов—декортикация, вегетативное существование). При неврологическом дефиците (9—12 баллов, группа Б) у собак выявлены нарушения координации движений, парезы конечностей, атаксия, повышенные мышечного тонуса. Характер неврологических расстройств этой группы животных, по-видимому, связан с нарушениями стриатной системы, обеспечивающей двигательную активность, регуляцию позы, мышечного тонуса. Проведенные исследования показали, что ДА, 5-ОТ и НА не оказывали активирующего влияния на АЦ в исследованных областях мозга животных групп А и Б (рис. 2).

В восстановительном периоде нарушения метаболизма сАМР в исследуемых областях мозга животных не нормализуется. Неблагоприятному течению пострестимуляционного периода (группа А) сопутствовало значительное снижение содержания сАМР в коре более чем на 50% ($p < 0,01$), в стриатуме—на 67% ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (рис. 1).

У животных с неврологическим дефицитом 9—12 баллов (группа Б) содержание сАМР в коре головного мозга и стриатуме было на 25% ($p < 0,01$) и на 34% ($p < 0,01$) соответственно ниже по сравнению с контрольными значениями.

Как известно, уровень cAMP определяется активностью ферментов, катализирующих его синтез—АЦ и распад—ФДЭ. Сопоставление изменений активности АЦ и ФДЭ в исследуемых областях мозга животных, перенесших клиническую смерть, обнаружило противоположную направленность сдвигов показателей, что, по-видимому, определяется функциональными особенностями соответствующих структур и разной устойчивостью к гипоксии. Так, в сером веществе головного мозга животных (группа А) активность АЦ более чем в 2 раза ниже, а в стриатуме в 2,5-раза выше контрольных значений (таблица). Активность ФДЭ в стриатуме этой группы животных, напротив, значительно превосходила контрольный уровень, а в коре мозга была почти вдвое меньше, чем в контроле (неопубликованные данные). Аналогичные данные были получены в отношении животных группы Б.

Обсуждение результатов

С точки зрения функциональной значимости ферментов как регуляторов содержания циклических нуклеотидов, разнонаправленные изменения активности АЦ и ФДЭ в коре и стриатуме животных в постреанимационном периоде дают основания полагать, что в сером веществе головного мозга решающее значение имеет система регуляции активности АЦ. Уменьшение активности АЦ, низкая чувствительность фермента к стимуляции биогенными аминами в коре головного мозга лежит в основе механизмов, формирующихся при клинической смерти и в постреанимационном периоде и снижающих устойчивость аденилатциклазной системы в этой (филогенетически более молодой) области мозга в значительно большей степени, чем в стриатуме. Это согласуется с представлениями о роли cAMP как внутриклеточного медиатора симпатической системы в механизмах нейрогуморальной регуляции функций нервной ткани при ишемии и в постишемических состояниях [8]. В стриатуме более значимым механизмом подавления адренергической фазы метаболической активности является активация системы ФДЭ.

Совокупность приведенных в литературе данных об активации ФДЭ свидетельствует о ее сходстве с системой проведения и трансформации сигнала с участием АЦ. Действие различных биологически активных веществ на изменение содержания cAMP может быть опосредовано как через влияние на систему синтеза, так и распада этого нуклеотида [9]. Существенную роль в регуляции активности ФДЭ играют различные состояния агрегированности молекулы фермента, изменения и диссоциация этого агрегата под влиянием агентов липидной природы, а также активация при ограниченном протеолизе [10].

Снижение стимулированной катехоламинами активности АЦ свидетельствует об изменениях чувствительности нейронов к биологически активным веществам, определяющейся их сродством к рецепторам, количеством рецепторов и степенью их функционального сопряжения с АЦ [11]. Нельзя исключить также, что этот эффект связан с измене-

ниями эффективной концентрации катехоламинов, с нарушениями нейроэндокринного статуса у животных, перенесших терминальное состояние [12]. Такие изменения сопровождаются значительным снижением концентрации сАМР, что коррелировало в наших экспериментах со степенью неврологического восстановления.

Низкий уровень сАМР в ткани мозга животных в постреанимационном периоде, по-видимому, является ведущим фактором в комплексе внутриклеточных изменений, приводящих к нарушениям таких процессов, как биосинтез церебральных белков, нейромедиаторов, фосфорилирование макромолекул, обеспечивающих проницаемость мембран для ионов и метаболитов.

Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют, что на каталитические и регуляторные свойства АЦ, а также на механизмы функционального сопряжения адренорецепторов с ферментом значительное влияние оказывают процессы протеолиза, изменения физико-химических свойств белков, накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Показано, что эти факторы являются ведущими в механизмах развития постреанимационной энцефалопатии [13]. Усиление реакций ПОЛ связано с нарушениями проницаемости лизосом и активацией гидролитических ферментов [14]. В свою очередь, лабильности мембран лизосом способствует низкий уровень сАМР [15]. Накопление продуктов ПОЛ вызывает тяжелые последствия—разобщение окислительного фосфорилирования, дезинтеграцию мембранных белков и фосфолипидов, изменения проницаемости мембран, приводящие к нарушениям ионного равновесия, в частности к значительному увеличению внутриклеточного содержания Ca^{2+} . Изменения в обмене Ca^{2+} , зависящие от уровня сАМР, являются пусковым механизмом в цепи патологических процессов, приводящих к глубоким нарушениям нервной ткани [16].

Известно, что помимо рецепторзависимых Ca^{2+} -каналов в тканях мозга функционируют также Ca^{2+} -каналы, активность которых зависит от протеинкиназных реакций, регулируемых циклическими нуклеотидами [17]. Фосфорилирование канальных белков модулирует Ca^{2+} -канал, изменяя его функциональное состояние, что в конечном итоге определяет физиологический ответ нейрона.

Таким образом, полученные в ходе исследования изменения аденлатинциклазной системы позволили раскрыть один из механизмов нарушений синаптической передачи в ткани головного мозга, связанный с сАМР при клинической смерти и в постреанимационном периоде. Очевидно, что выявленные нарушения в обмене циклических нуклеотидов, наряду с другими элементами постреанимационного процесса, являются существенным патогенетическим фактором постгипоксической энцефалопатии.

Автор признателен В. А. Ткачуку за плодотворную дискуссию и за предоставленную возможность проведения экспериментов в Лаборатории молекулярной эндокринологии ВКНЦ АМН СССР.

ADENYLATE CYCLASE SYSTEM OF BRAIN IN CLINICAL DEATH AND IN POST-RESUSCITATION PERIOD

PYLOVA S. I.

Institute of General Reanimatology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The cAMP levels and adenylate cyclase (AC) activity in the grey substance and striatum of dog brain during systemic circulation arrest caused by 1—2 & 15-min duration electrotrauma and in post-resuscitation period in animals who suffered 15 min—long clinical death have been studied.

It was ascertained that during systemic circulation arrest in the brain areas mentioned AC activation is accompanied by a considerable increase in cAMP level. Noradrenalin (NA), serotonin (5—HT) have activated AC in grey substance and striatum in control and experimental animals during 1—2 min of complete ischemia. During 15 min of blood circulation arrest NA-stimulated AC activity in brain cortex was lower, and in striatum—considerably higher than the basal level. 5—HT did not have an activating effect on the AC; dopamin (DA) caused an increase in AC activity in striatum both in intact and in experimental animals during 1—2 & 15 min period of complete circulation arrest.

In the post-resuscitation period (2—5 days) cAMP metabolic changes are not normalized in animals with different degrees of neurologic status recovery. The cAMP concentration in brain tissues is considerably low. The multi-faceted nature of changes in the AC and PDE activity has been revealed: the activity of the cortex enzymes is lower, and in striatum it is undoubtedly higher than in control ones. DA, 5—HT, NA did not have an activating effect on the brain AC in the post-resuscitation period. It was shown, that the degree of metabolic changes depends on the completeness of neurologic status recovery.

ЛИТЕРАТУРА

1. Неговский В. А., Гураин А. М., Золотокрылина Е. С.—В кн.: Пострезанимационная болезнь, с. 205—217, М., Медицина, 1979.
2. Safar P. Arch. Neurol., v. 33, p. 91—95, 1976.
3. White A. Methods Enzymol., N. Y., Acad. Press., v. 38 p. 41—46, 1974.
4. Гублер Е. В.—В кн.: Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов, с. 71—73, А., Медицина, 1978.
5. Strjö B. K., Witeloth T. Brit. J. Anaesth., v. 57, № 1, p. 47—62, 1985.
6. Bernstein K. J., Verosky M., Triner B. A., Triner L. Anesthesiology, v. 59, № 3, A—237, 1983.
7. Панди Д. Н., Дейков Д. М.—В кн.: Нейрофармакология циклических нуклеотидов, с. 138—176, М., Медицина, 1982.
8. Ho R. J. Metabolism, v. 24, p. 257—264, 1975.
9. Bitensky M. V., Wheeler G. L., Aloni B., Vetryu S., Mutuo J. In: Adv. Cyclic. Nucl. Res., v. 9, p. 553—572, 1978.

10. Этингоф Р. Н., Думлер И. А. Нейрохимия, т. 1, № 1, с. 87—98, 1982.
11. Ткачук В. А.—В кн.: Введение в молекулярную эндокринологию, с. 110—114, 1983.
12. Butterworth R. F. Neurochem. International., v. 4, № 6, p. 449—464, 1982.
13. Молчанова Л. В., Пылова С. И., Кожура В. А. Анест. и реаним., № 5, с. 43—47, 1979.
14. Yoshida S., Inoh S., Assano T., Sano K. J. Neurosurg, v. 53, p. 323—331, 1980.
15. Коровкин Б. Ф. Вестн. АМН СССР, № 9, с. 69—73, 1982.
16. Henser D., Guggenberger H. Brit. J. Anaesth., v. 57, № 1, p. 23—33, 1985.
17. Костюк П. Г., Дорошенко П. А., Мартынюк А. Е., Курский М. Д., Воробез Э. Д. Докл. АН СССР, т. 271, с. 756—758, 1983.

Поступила 11. I 1987

Белки возбудимых мембран. J. Wiley and Sons Ltd. 348 с., 1987.
Proteins of excitable membranes (B. Hille and D. M. Fambrough, eds.). J. Wiley and Sons Ltd, Baffins Lane, England, 348 p., 1987.

Статьи, отобранные для этого сборника, содержат последние сведения о мембранной функции и строении возбудимых белков. В работах приводится кинетический анализ работы каналов и циклической деятельности ионных насосов, рассматривается действие лекарственных препаратов и токсинов в качестве агонистов, описывается очистка и функциональная реконструкция белков, сборка субъединиц в комплексы и т. п.

Книга дает представление о характере функционирования мембран, сочетая функциональные, структурные и химические подходы.

Содержание отдельных глав:

Новые работы по бактериородопсину. Функция никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. Функциональные участки и переходные состояния никотинового ацетилхолинового рецептора. Топологическая карта и ионный канал ацетилхолинового рецептора. Координированная регуляция экспрессии синаптических белков в скелетных мышцах. Исследование ацетилхолинового рецептора. Взаимоотношения между структурой и функцией натриевого канала. Потенциалзависимые натриевые каналы: эволюционно-молекулярный подход. Изучение ионных каналов, реконструируемых в липидных бислоях: выводы о молекулярных механизмах, заключаемые по результатам регистрации работы одиночных каналов. Множественные типы кальциевых каналов в возбудимых клетках. Потенциалзависимое связывание и действие энантиомеров 1,4-дигидропиридина в интактных клетках сердца. Влияние проникающих ионов и блокаторов на свойства одиночных кальциевых каналов из мозга. Характеристика отдельных реакций в каталитическом и транспортном цикле АТФазы саркоплазматического ретикулула: строение Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулула. Кальциевые АТФазы—приложение молекулярной генетики для понимания их структуры и функции.