

Нарушения сигнальной трансдукции и кооперативных липидных модификаций в коре головного мозга крыс при гипокинезии и под влиянием пираретама

К.В.Мелконян

Кафедра фармакологии ЕреГМУ им.М. Гераци

375025, Ереван, ул.Корюна, 2

Ключевые слова: гипокинезия, сигнальная трансдукция, фосфоинозитидный цикл, липидные модификации, пираретам, нейропротекция

Парадокс развития цивилизации заключается в том, что по мере роста научно-технического прогресса возрастает агрессивность факторов риска, связанных с образом жизни, значительная роль которых принадлежит ограниченной двигательной активности, или гипокинезии (ГК) [1,12]. Механизмы патогенеза гипокинетических повреждений головного мозга, сопровождающиеся ишемией мозговой ткани, выявлены не полностью [2,9].

При экстремальных воздействиях, требующих от организма предотвращения развития дезинтеграции функциональных систем путем мобилизации всех резервов, наиболее показательными и системообразующими факторами оказались определенные метаболические и структурно-функциональные сдвиги в синаптоархитектонике мозговых структур [3]. Лидирующая роль последних обусловлена главным образом их основной позицией в реализации постоянно совершающейся трансдукции внешнего сигнала внутри клетки как основного условия в обеспечении ее физиологической активности и целостности [13].

В связи с изложенным нами расширяются исследования по изучению изменений сигнальной трансдукции, в частности функциональной активности фосфоинозитидного цикла (ФИЦ), и кооперативных липидных модификаций в синаптосомальных мембранах нейронов коры головного мозга в условиях ГК, а также по изучению на этом фоне особенностей действия циклического аналога γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), пираретама с учетом роли эндогенной ГАМК-системы в регуляции сигнальной трансдукции в ЦНС [1,5,11].

Материал и методы

Исследования проводились на 56 беспородных белых крысах-самцах массой 140–170г. ГК моделиро-

вали в индивидуальных узких клетках, где животных содержали 30 дней. В течение последних 3 дней этого срока животным внутривенно вводили пираретам (ноотропил, Польша) в дозе 20 мг/кг через каждые 24 ч. Последнюю инъекцию проводили за 30 мин до декапитации.

Синаптосомы коры больших полушарий головного мозга выделяли согласно стандартной методике F.Hajos [8] в 50 мл трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 0,32М сахарозы. Предварительное включение 1мкКи [1-14C]-арахидоновой кислоты (АК) (специфическая активность 55мКи/ммоль "Amersham", UK) в фосфолипидные (ФЛ) фракции синаптосом было осуществлено путем добавления в среду инкубации лизоФЛ в качестве акцептора свободной жирной кислоты [6]. После 60 мин инкубации остатки невключенной АК были удалены промыванием синаптосом 15 мл 0,2% водного раствора альбумина, свободного от жирных кислот. Инициацию ФИЦ в синаптосомах вызывали путем K^+ -индуцированной стимуляции. K^+ деполяризацию синаптосомальных мембран проводили в среде выделения клеток, содержащей 20мМ Na^+ , 120мМ K^+ . Контрольные пробы содержали 20 мМ K^+ , 120 мМ Na^+ . На ранних этапах (5 сек) и в более поздние сроки (5 мин) инкубаций проб в качающейся водяной бане реакции останавливали добавлением 2 мл холодной смеси хлороформ – метанол (1:2 объем/объем), затем осуществляли экстракцию, фракционирование и идентификацию липидов [7].

Распределение радиоактивности в идентифицированных соответствующими стандартами ФЛ фракциях ("Sigma") определяли сканированием пластинок с помощью радиосканирующего прибора ("Berthold", ФРГ). Степень радиоактивности липидных фракций определяли на сцинтилляционном спектрометре "Roche – Bioelectronique Kontron" (SL-4221, Франция).

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с использованием

t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При добавлении в среду инкубации лизофосфоинозита (лизоФИ) обнаружено преимущественное (более 50% от суммы включенной радиоактивности) накопление меченой АК во фракции ФИ синапсом крыс как в норме, так и при ГК. Учитывая этот факт, можно утверждать, что более чем 30% увеличение количества 1,2-диацилглицерина (1,2-ДГ) на 5-й сек K^+ -индуцированной активации ФИЦ синапсом нор-

мальных крыс является результатом активации ФИ-ФДЭ (фосфодиэстераза) или фосфолипазы С (ФЛазы С) (рис.1). Аналогичная картина наблюдается также при ГК, что указывает на относительную стабильность сигнальной трансдукции (по сравнению с нормой) на мембраносвязанном этапе (5 сек) ее инициации.

Интересно отметить, что, несмотря на отсутствие значительных изменений в сигнальной трансдукции в норме и при ГК, были установлены различные уровни лизофосфатидилхолина (лизоФХ), моноглицеридов (МГ), АК и триглицеридов (ТГ).

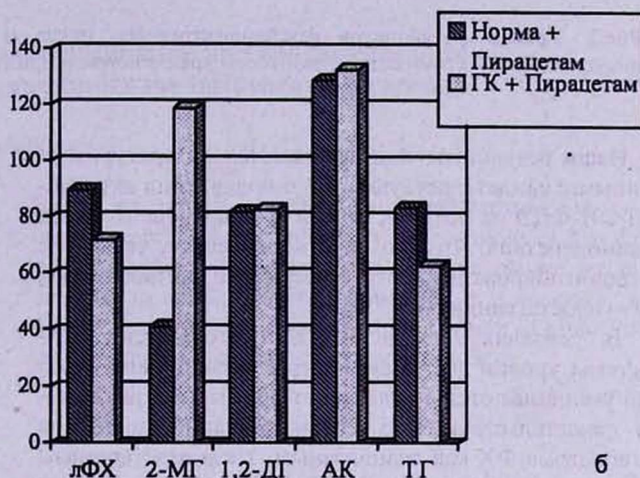
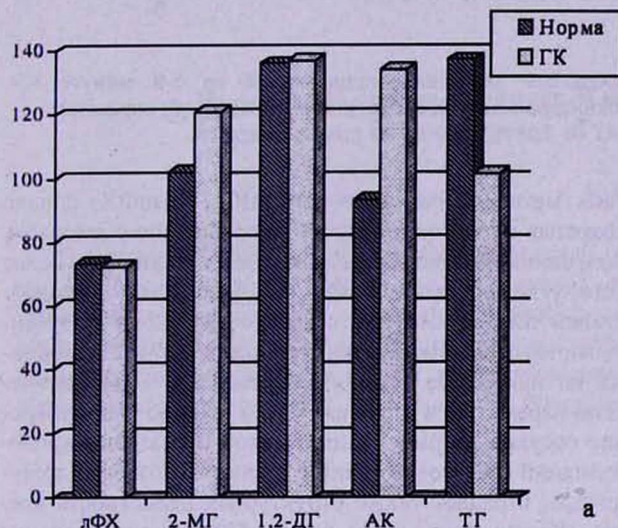


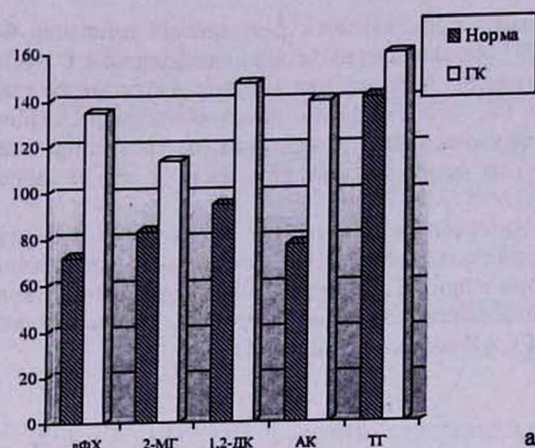
Рис.1. Уровни метаболитов фосфоинозитидного цикла и процессов липидных модификаций на 5-й секунде K^+ -индуцированной стимуляции синапсом крыс в норме и при гипокинезии в отсутствие (а) и под влиянием (б) пирацетама

Так, активация ФИЦ в норме сопровождается кооперативной стимуляцией механизмов нейтрализации как лизоФХ, так и свободной АК, обладающими мембранолитическими свойствами, более того усиливается образование ТГ, тогда как при ГК наблюдается угнетение утилизации лизоФХ, МГ и АК с одновременным снижением уровня ТГ, что свидетельствует о превалировании процессов катаболизма липидов в синапсомембранных мембранах.

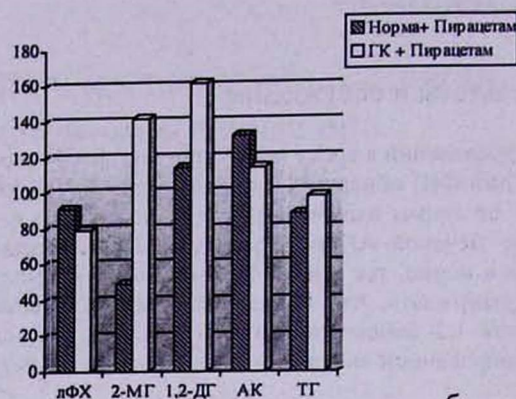
Интересные данные получены при изучении влияния пирацетама на активность ФИЦ и процессы липидных модификаций на ранних этапах (5 сек) K^+ -стимуляции ФИЦ. Так, пирацетам оказывает одностороннее действие на активность ФИ-ФДЭ в норме и при ГК, что проявляется в значительном снижении уровня 1,2-ДГ по сравнению с данными, полученными в норме без введения пирацетама (рис.1). Важно отметить, что в условиях ГК пирацетам приводит также к резкому снижению уровня лизоФХ, тогда как в норме наблюдается тенденция к повышению уровня этой фракции. В то же время в норме под воздействием

пирацетама многократно снижается содержание ТГ с одновременным повышением уровня АК по сравнению с данными, полученными без введения пирацетама. Аналогичные изменения регистрируются также в условиях ГК, однако наблюдается тенденция к снижению уровня АК, к сожалению, оставаясь выше нормального.

На 5-й мин K^+ -деполяризации синапсом крыс в норме обнаружено (рис.2) понижение уровня всех метаболитов катаболизма мембранных ФЛ ниже контрольного, что свидетельствует о компенсаторном угнетении катаболических процессов в синапсомембранных мембранах. Более того, наблюдается активация анаболических процессов, что проявляется в усилении синтеза ТГ. Эти данные могут быть результатом вовлечения в формирование клеточных ответов как мембранных липид-модифицирующих систем, так и различных внутриклеточных регуляторных механизмов на более поздних этапах (5 мин) стимуляции ФИЦ.



а



б

Рис.2. Уровни метаболитов фосфоинозитидного цикла и процессов липидных модификаций на 5-й минуте K^+ -индуцированной стимуляции синапсом крыс в норме и при гипокинезии в отсутствие (а) и под влиянием (б) пирацетама

Наши результаты подтверждаются литературными данными, свидетельствующими о подавлении активности ФИ-ФДЭ на поздних этапах агонист-рецепторного взаимодействия, что, по всей вероятности, связано с ретроингибированием этого фермента метаболитами АК – простагландинами [14].

В условиях ГК на 5-й мин стимуляции ФИ-системы уровни всех метаболитов исследуемых реакций увеличиваются в отличие от нормы. Эти результаты свидетельствуют об интенсификации процессов катаболизма ФХ как деацилазным, так и дезэстеразным путями, что сопровождается усиленной утилизацией образованной свободной АК во фракции ТГ.

Относительно действия пирацетама на более поздних этапах (5 мин) K^+ стимуляции ФИЦ важно отметить угнетение синтеза ТГ как в норме, так и при ГК, которое в норме сопровождается накоплением АК и повышением уровня лизоФХ, тогда как при ГК уровень свободной АК снижается с одновременным снижением уровня лизоФХ.

Исходя из представленных данных, можно заключить, что 30-дневная ГК у крыс приводит к превалированию процессов катаболизма ФЛ в мембранах синапсом на фоне относительной стабильности сигнальной трансдукции. В условиях ГК пирацетам угнетает нейротрансмиссию, тем самым подавляя нейропластичность. Негативное действие пирацетама слегка смягчается на относительно поздних этапах активации ФИЦ благодаря снижению уровней мембранолитиче-

ских метаболитов, таких как АК и лизоФХ, однако сохраняя их высокие уровни по сравнению с данными, полученными в норме без введения пирацетама. Более того, угнетаются анаболические процессы под воздействием пирацетама. Это согласуется с ранее полученными нами данными о негативном действии пирацетама на некоторые гемодинамические и морфологические параметры в условиях ГК, а именно – полнокровие сосудов, формирование отеков и очаговых кровоизлияний в мозговой ткани и полостях мозговых желудочков, страдает также структурная целостность клеток. Кроме того, нами было обнаружено угнетение утилизации глюкозы мозговой тканью в условиях 30-суточной ГК, что более усугубляется под воздействием пирацетама [4,10].

Угнетение нейропротективной активности пирацетама в условиях ГК может быть результатом снижения энергообразования, а также расширения мозговых кровеносных сосудов, что более выражено при ишемических состояниях, приводящих к усугублению развиваемой при ГК постишемической реперфузии с дальнейшим развитием вторичных повреждений мозговой ткани.

Полученные данные служат основанием для пересмотра показаний назначения пирацетама в качестве ноотропного средства в неврологической практике, вплоть до избегания назначения пирацетама лицам, находящимся на длительном постельном режиме и, особенно, при ишемических инсультах.

Поступила 23.11.05

Ազդանշանային գրգռափոխանցման եւ կոդաբերափոխ ճարպային փոխանակությունների փոփոխությունները առնետների գլխուղեղի կեղեւում սակավաշարժության պայմաններում եւ պիրացետամի ազդեցության տակ

Կ.Վ.Մելքոնյան

Աշխատանքում ցույց է տրված սակավաշարժ կենսաձևի դերը ուղեղի իշեմիկ ախտահարման զարգացման մեջ: Ցույց է տրված, որ ուղեղի կեղևի սինապտոսոմալ թաղանթներում ֆոսֆոլիպիդների կատարելիքը գերակշռում է ամաբոլիկ պրոցեսներին՝ ազդանշանային գրգռափոխանցման հարաբերականորեն կայուն ֆունկցիայի վրա: Սակավաշարժության պայման-

ներում պիրացետամը դրսևորում է նյարդագրգռափոխանցման ընկճող ազդեցություն՝ դրանով իսկ ընկճելով նեյրոպլաստիկությունը: Պիրացետամից առաջացող այս փոփոխությունները հիմք են տալիս վերանայելու նյարդաբանական պրակտիկայում պիրացետամի՝ որպես մոտորային միջոցի նշանակման ցուցումները:

Hypokinesia-induced changes of signal transduction and cooperative lipid modifications in brain cortex in rats and under the influence of piracetam

K.V.Melkonyan

The presented work demonstrates the involvement of the hypokinetic mode of life in the pathogenesis of ischemic brain injury. It is shown that catabolism of phospholipids prevails over anabolic processes in synaptosomal membranes of brain cortex; at the same time signal transduction processes are not altered. Piracetam

exerts an inhibitory effect on neurotransmission and hence suppresses neuroplasticity in conditions of hypokinesia. Taking into account the changes caused by piracetam in conditions of hypokinesia, it is necessary to reconsider the indications for administration of piracetam as a nootropic agent in neurological practice.

Литература

1. Акопян В.П. Участие системы ГАМК в адаптивной перестройке мозгового кровообращения в условиях гипокинезии. Ж. exper. и клин. фармакол., М., 2003, 66 (3), с.4.
2. Акопян В.П., Мелконян К.В., Тадевосян Ю.В., Батикян Т.Б. Влияние ГАМК на фосфоинозитидный цикл и модификации мембранных липидов синапсом мозга крыс в условиях гипокинезии. Ж. exper. и клин. фармакол., 2003, 66 (5), с.6.
3. Боголепов Н.Н. О пластичности синапсов коры больших полушарий головного мозга. Мозг: теоретич. и клинич. аспекты, М., 2003, с.106.
4. Мелконян К.В. Некоторые особенности гемодинамических, метаболических и морфологических изменений в головном мозге в условиях гипокинезии и под влиянием ГАМК-ергических веществ. Автореф. канд. дис., Ереван, 1993, с. 28.
5. Сергеев П.В., Валеева Л.А., Шимановский Н.Л. ГАМК-рецепторы и сердечно-сосудистая система. Ж. exper. и клин. фармакол., 1998, 61(3), с. 81.
6. Тадевосян Ю.В., Карагезян К.Г., Батикян Т.Б. Кооперация функционирования фосфолипазы A₂ и ФИ-специфичной ФДЭ синапсом мозга крыс при инициации ФИЦ. ДАН СССР, 1987, 295(5), с. 1254.
7. Тадевосян Ю.В., Асатрян Л.Ю., Батикян Т.Б. и др. Биохимия, 1996, 61(8), с. 1414.
8. Hajos F. An improved method for the preparation of synaptosomal fraction in high purity, Brain Research, 1975, 93(3), 1975, p. 485.
9. Hakopian V.P. Hypokinesia and Cerebral Blood Circulation. Athens, Greece, 2002.
10. Hakopian V.P., Melkonyan K.V., Kevorgian G.A., Kanayan A.S. Effects of GABA-ergic substances on cerebral blood flow and i.c. Ca²⁺ in hypokinesia. In: Neurochemistry. New York, 1997, p.1083.
11. Klapstein C.J. Colmers W.F. British J. Pharmacology, 1992, 105(2), p. 470.
12. Melkonyan K.V. Relationship between cerebrovascular diseases and hypokinesia, Offic. J. of the European Atherosclerosis Society, 2005, vol. 6/1, p.149.
13. Melkonyan K.V. Calcium homeostasis and signal transduction in brain cortex in conditions of hypokinesia, J. of Neurochemistry, vol.94, Suppl.2, 2005, p.392, p.204.
14. Rapallino M.V., Cupello A., Mainardi P. et al. Neurochem. Res., 1990, 15(6), p. 593.