

Влияние гипотермии на каталитические свойства ацетилхолинэстеразы мембран эритроцитов крыс.

Исраилова Лейла Абдулмуслимовна

Студент (бакалавр)

Дагестанский государственный университет, Россия

E-mail: isr.leila04@gmail.com

Искусственная гипотермия у термостатических животных способствует стимуляции свободнорадикальных процессов. Предыдущие исследования показали, что кратковременная умеренная гипотермия (температура тела 30°C) и ее продление на 1,5 ч значительно активируют процессы окислительной модификации липидов и белков эритроцитов, сопровождающейся повреждением различных клеточных структур, в том числе и плазматической мембраны [1]. Окислительная деструкция липидов и мембранных белков может влиять на структуру и свойства мембраноассоциированных ферментов, рецепторов и транспортных белков. Одним из ферментов, закрепленных во внешней мембране эритроцитов, является ацетилхолинэстераза (АХЭ). Нейрональные и некаталитические функции АХЭ привлекает в последние годы большое внимание. Обнаружено, что эритроцитарная АХЭ может принимать участие в метаболизме оксида азота, регуляции аффинности гемоглобина к кислороду и активности метгемоглобинредуктазы и гликолитических ферментов. Для более глубокого понимания последствий окислительного повреждения мембран эритроцитов, мы исследовали зависимость активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и структурно-функционального состояния мембраны от времени воздействия холодого фактора. Эксперименты проводили на самцах крыс линии Вистар. Температуру тела крыс снижали до 30°C путем внешнего охлаждения (кратковременная умеренная гипотермия). Затем проводили длительную гипотермию в течение 1,5 и 3 ч. После осмотического гемолиза отмытых эритроцитов получали эритроцитарные мембраны, в которых измеряли активность АХЭ по методу Элмана [2]. Результаты исследования демонстрируют, что снижение температуры тела крыс способствует повышению активности фермента и существенным пертурбациям его каталитических характеристик. Исследование показало, что кратковременная гипотермия сопровождается увеличением максимальной скорости АХЭ (V_{max}) и снижением константы Михаэлиса (K_m). Такое повышение V_{max} на фоне падения K_m приводит к резкому росту каталитической эффективности фермента и смещению точки оптимума на графике зависимости скорости катализа от концентрации субстрата в область более низких значений. После длительной (3 ч) гипотермии кинетические свойства АХЭ изменяются в направлении нормализации активности и каталитических свойств фермента. Для более подробного анализа изменений в молекуле АХЭ при гипотермии, мы изучили её термостабильность, которая очень чувствительна к конформационным изменениям белка. Исследование показало, что кинетика тепловой денатурации фермента нелинейная, то есть денатурация АХЭ проходит в 2 фазы: быструю и медленную, каждая из которых характеризуется собственной каталитической константой. Анализ температурной зависимости констант денатурации показал, что умеренная кратковременная гипотермия способствует снижению энергии активации денатурации АХЭ и повышению константы скорости денатурации для быстрой фазы (k_1), при этом длительная гипотермия (3 ч) снижает константы скорости быстрой и медленной фаз денатурации (k_1 и k_2) по сравнению с кратковременной гипотермией и повышает энергию активации денатурации. Полученные данные свидетельствуют о лабилизации структуры АХЭ на ранних стадиях наступления гипотермии. Нормализации скорости каталитической реакции и кинетических параметров АХЭ способствует его стабилизация на ранних стадиях наступления гипотермии и

при длительной гипотермии. Исследование структурных свойств мембран эритроцитов с помощью флуоресцентного зонда пирена выявило значительные изменения структурных и динамических свойств мембран эритроцитов после 1,5 часов гипотермии, направленные на изменение её микровязкости. Длительная гипотермия (3 ч) снижала микровязкость как общих, так и циклических липидов, и нормализации этих показателей. Корреляционный анализ показал, что показатели структурного состояния мембран эритроцитов при гипотермии коррелируют с рядом каталитических параметров. Показатель структурного состояния мембраны эритроцитов при гипотермии коррелируется рядом кинетических свойств АХЭ. На основании полученных данных можно сделать вывод, что длительная умеренная гипотермия в течение 3 часов способствует включению адаптивных механизмов АХЭ, направленных на компенсацию низкотемпературного воздействия для нормализации мембранной функции.

Источники и литература

- 1) Аль-Рабии М. А. М. Свободнорадикальный гомеостаз и структурно- функциональное состояние мембран эритроцитов крыс при гипотермии, 2015
- 2) Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V. and FeatherStone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.