

Odloženi uticaj perinatalnog stresa na aktivnost acetilholinesteraze u mozgu pacova

Ispitivan je uticaj perinatalnog stresa na aktivnost acetilholinesteraze u sinaptosomalnoj i mitohondrijalnoj frakciji korteksa i hipokampusa pacova. Stres je indukovao odvajanjem mladunaca od majke devetog postnatalnog dana, tokom 24h. Aktivnost AchE je merena metodom po Elmanu i saradnicima (Ellman et al. 1961). Rezultati pokazuju značajnu razliku u aktivnosti u mitohondrijalnim frakcijama korteksa i hipokampusa, kao i u sinaptosomalnoj frakciji hipokampusa. Ispitivanje potvrđuje ranije rezultate iz ove oblasti i doprinosi stanovištu da perinatalni stres ima dugotrajne efekte koji se ispoljavaju u periodu adolescencije.

Uvod

Acetilholin (ACh) je neurotransmiter koji je prisutan u perifernom i centralnom nervnom sistemu. Sintetiše se pod katalitičkim dejstvom enzima holin acetiltransferaze a njegova razgradnja u sinaptičkoj pukotini se odvija pod delovanjem acetilholinesteraze. Holinergički sistem se projektuje u skoro sve strukture mozga. Promene aktivnosti enzima holin acetiltransferaze i/ili acetilholinesteraze mogu biti odgovorne za promene u nivou acetilholina u mozgu (Liu et al. 2000).

Ukoliko se aktivnost acetilholin esteraze blokira, dolazi do nakupljanja acetilholina i trajne depolarizacije holinergičke sinapse (Schumacher et al. 1986).

AChE poseduje dva mesta za interakciju sa ligandima: aktivno (hidrolitičko), na bazi dubokog

uskog grla, i periferno anjonsko mesto (PAS), koje se sastoji od negativno naelektrisanih rezidua na površini koja okružuje ulaz u grlo (Schumacher et al. 1986; Soreq i Seidman 2001). Primarna biološka funkcija AChE je hidroliza acetilholina.

Stresni događaji u ranoj fazi života čoveka često dovode do psihičkih poremećaja u odraslom dobu. Rano odvajanje mladunaca od majke (*separatio a matrem*) razmatrano je i prihvaćeno kao animalni model perinatalnog stresa. Odrasli pacovi koji su rano po rođenju bili odvajani od majke pokazuju dugotrajne promene u neuroendokrinom sistemu, mozgu i ponašanju, koje odgovaraju simptomatologiji kod obolelih od shizofrenije i afektivnih poremećaja (Husum et al. 2002). Brojna ispitivanja ukazuju na ulogu centralne holinergičke neurotransmisije u razvoju kognitivnih poremećaja u shizofreniji (Friedman et al. 2004; Mattsson et al. 2005).

Cilj ovoga rada je da se ispita odloženi uticaj jednodnevnog odvajanja (24h) pacova od majke 9. postnatalnog dana na aktivnost enzima acetilholinesteraze u kori i hipokampusu mozga pacova u periodu adolescencije (62. postnatalni dan).

Materijal i metode

Ispitivanje je vršeno na pacovima *Wistar* soja. Uporedo su praćena dva legla: eksperimentalno i kontrolno. Legla su sadržala po šest mladunaca muškog pola, a kratkotrajno odvajanje od majki je izvedeno prema proceduri koju su opisali Elenbrok i saradnici (Ellenbroek et al. 1998). U eksperimentalnoj grupi majka je 9. postnatalnog dana premeštena iz kaveza sa mladuncima u poseban kavez. Odvajanje majke je trajalo 24 sata, nakon čega je vraćena u kavez sa svojim mladuncima. Životinje su držane

Đorđe Đorović (1990), Beograd, Gočka 10, učenik 2. razreda XV beogradske gimnazije

u kavezima pri standardnim laboratorijskim uslovima, na temperaturi od 22°C i 14h svetla/10h mraka.

Pre žrtvovanja životinje su anestetizirane pentobarbital-natrijumom (Vetanarcol, Werfft-Chemie, Wien). Žrtvovane su cervikalnom dislokacijom i dekapitacijom. Nakon dekapitacije glave su zamrznute i čuvane na -80°C do momenta pripreme tkiva. Moždane strukture – kora i hipokampus, su odstranjene na ledu i nakon toga homogenizovane u staklenom homogenizeru sa teflonskim tučkom u 1.5 mL saharoznog medijuma. Neposredno po homogenizaciji uzorci su centrifugirani na 3000 obrtaja, 15 minuta. Supernatant je odvojen i sačuvan na +4°C, a talog resuspendovan u 0.5ml saharoznog medijuma i centrifugiran na 3000 obrtaja, 15 minuta. Prvi i drugi supernatant su zatim spajani i centrifugirani 30 minuta na 14000 obrtaja. Krajnji supernatant predstavlja sinaptosomalnu frakciju i čuvan je na -80°C do određivanja enzimske aktivnosti. Neprečišćena mitohondrijalna frakcija izolovana je resuspenzijom finalnog taloga u 1.5 mL dejonizovane vode, koji je potom ostavljen 60 minuta na 4°C uz povremeno mešanje na svakih 10 minuta. Ponovljeno je centrifugiranje na 4000 obrtaja 15 minuta. Talog je odbačen, a supernatant koji predstavlja neprečišćenu mitohondrijalnu frakciju je izdvojen i takođe čuvan na -80°C do određivanja enzimske aktivnosti.

Za određivanje sadržaja proteina korišćena je spektrofotometrijska modifikovana metoda Lourija (Lowry *et al.* 1951) koja se zasniva na reakciji peptidnih veza proteina sa bakrom u alkalnoj sredini, pri čemu se stvara kompleksno jedinjenje koje redukuje Folinov reagens i daje karakterističnu plavu boju sa apsorpcionim maksimumom na 550 nm.

Aktivnost acetilholinesteraze u sinaptosomalnoj i mitohondrijalnoj frakciji korteksa i hipokampusa mozga pacova određivana je po metodi Elmana i

saradnika (Ellman *et al.* 1961). Princip metode je da acetilholinesteraza razlaže acetiltioholin jodid, čiji se proizvod razlaganja (tioholin) vezuje sa DTNB-om (di-tio-bis-nitrobenzojeva kiselina) dajući 5-tio-2-nitrobenzojevu kiselinu koja pokazuje maksimum apsorpcije na 412 nm. Promena apsorbance usled porasta koncentracije ovog jedinjenja praćena je u toku 3 minuta na $\lambda_{max} = 412$ nm.

Aktivnost acetilholinesteraze A_a (u mol/mg proteina/min) izračunata je prema formuli:

$$A_a = \frac{\Delta A}{1.36 \cdot 10^4} \cdot \frac{1}{\frac{100}{1095} \times C} = 8.05 \cdot 10^{-4} \times \frac{\Delta A}{C}$$

gde je ΔA – promena apsorbance merena u toku jednog minuta na 412 nm, $1.36 \cdot 10^4$ – molami apsorpcioni koeficijent 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline, 100 – zapremina uzorka u μL , 1095 – ukupna zapremina u kivetu u mL i C – koncentracija proteina u uzorku (mg/mL).

Rezultati i diskusija

Aktivnost acetilholinesteraze korteksa i hipokampusa životinja u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi prikazana je u tabeli 1.

U sinaptosomalnoj frakciji korteksa nije zapažena statistički značajna razlika u aktivnosti acetilholinesteraze između eksperimentalne i kontrolne grupe životinja.

Aktivnost acetilholinesteraze je u sinaptosomalnoj frakciji hipokampusa bila statistički značajno smanjena u eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($p < 0.001$).

Aktivnost acetilholinesteraze određena u mitohondrijalnoj frakciji korteksa eksperimentalne grupe bila je statistički značajno smanjena u odnosu na ak-

Tabela 1. Aktivnost acetilholinesteraze u mol/mg proteina/min ($\times 10^{-4}$)

	Mitohondrijalna frakcija		Sinaptosomalna frakcija	
	Kontrolna grupa (n = 6)	Eksperimentalna grupa (n = 6)	Kontrolna grupa (n = 6)	Eksperimentalna grupa (n = 6)
Korteks	0.084±0.009	0.039±0.019*	0.038±0.001	0.04±0.001
Hipokampus	0.333±0.045	0.152±0.02*	0.091±0.004	0.07±0.01*

* - $p < 0.05$

tivnost enzima u mitohondrijalnoj frakciji korteksa kontrolne grupe ($p < 0.01$).

Određivanjem aktivnosti acetilholinesteraze u mitohondrijalnoj frakciji hipokampusa takođe je pokazano statistički značajno smanjenje u eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu pacova ($p < 0.001$).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju dugotrajne efekte perinatalnog stresa na holinergički sistem u mozgu pacova. Odložene promene aktivnosti AChE zapažene su u periodu adolescencije kada se vrši sinaptičko preuređivanje karakteristično za ovaj period.

Primarna biološka funkcija AChE je hidroliza acetilholina i smanjena aktivnost ovog enzima se može odraziti na holinergičku transmisiju. U neuronalnim i hematopoetskim ćelijama su, međutim, pokazane i alternativne funkcije AChE (Soreq i Seidman, 2001). AChE je uključena u ćelijsku adheziju, proliferaciju, rast neurita u različitim tipovima neurona, uključujući i ne-holinergičke neurone (Thullbery *et al.* 2005).

Talberi i saradnici (Thullbery *et al.* 2005) su pokazali da je aktivnost AChE merena pomoću Eimanovog eseja u korelaciji sa ekspresijom ovog enzima u neuronalnim ćelijama. Nalaz smanjene aktivnosti AChE u ovom istraživanju, shodno tome, ukazuje na izmenjenu ekspresiju ovog proteina u pojedinim strukturama mozga pacova izloženih perinatalnom stresu, koja se može odraziti na ekspresiju sinaptičkih proteina.

Zaključak

Studije o stresu u ranoj fazi života, na modelu perinatalnog stresa na pacovima, pokazale su postojanje trajnih promena u različitim neurotransmiterskim sistemima u mozgu, uključenim u emocionalnost (Holmes *et al.* 2005; Giachino *et al.* 2007).

Prisustvo promena u aktivnosti AChE u mozgu životinja koje su bile izložene ranom odvajanju od majke, uočeno u ovom istraživanju, ukazuje da perinatalni stres ima dugotrajne efekte koji se ispoljavaju u periodu adolescencije. Smanjena ekspresija AChE bi, obzirom na ulogu ovog enzima u sinaptogenezi, neuritogenezi i ćelijskoj adheziji, mogla poremetiti uspostavljanje adekvatnih sinaptičkih kontakata i restrukturiranje sinapsi koje se u periodu adolescencije intenzivno odigrava.

S obzirom da je perinatalni stres jedan od animalnih modela shizofrenije, sagledavanje uloge holinergičkog sistema u patogenezi promena pokrenutih perinatalnim stresom može biti značajno za razumevanje patogenetskih promena u shizofreniji i može doprineti razvoju novih terapijskih pristupa kao i preventivnih postupaka kod osoba sa visokim rizikom za pojavu ovog oboljenja.

Literatura

- Dong H., Xiang Y. Y., Farchi N., Ju W., Wu Y., Chen L., Wang Y., Hochner B., Yang B., Soreq H., Lu W. Y. 2004. Excessive expression of acetylcholinesterase impairs glutamatergic synaptogenesis in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, **24**: 8950-8960.
- Ellenbroek B. A., van den Kroonenberg P. T., Cools A. R. 1998. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophrenia Research*, **30**: 251.
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr, Feather-Stone R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**: 88
- Friedman J. I. 2004. Cholinergic targets for cognitive enhancement in schizophrenia: focus on cholinesterase inhibitors and muscarinic agonists. *Psychopharmacology (Berl)*, **174**: 45.
- Giachino C., Canalia N., Capone F., Fasolo A., Alleva E., Riva M. A., Cirulli F., Peretto P. 2007. Maternal deprivation and early handling affect density of calcium binding protein-containing neurons in selected brain regions and emotional behavior in periadolescent rats. *Neuroscience*, **145**: 568.
- Holmes A., le Guisquet A. M., Vogel E., Millstein R. A., Leman S., Belzung C. 2005. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **29**: 1335.
- Husum H., Termeer E., Mathe A. A., Bolwig T. G., Ellenbroek B. A. 2002. Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats. *Neuropharmacology*, **42**: 798.
- Layer P. G., Weikert T., Alber R. 1993. Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. *Cell Tissue Research*, **273**: 219.

Liu D., Diorio J., Day J. C., Francis D. D., Meaney M. J. 2000. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature Neuroscience*, **3**: 799.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. L. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265.

Mattsson A., Lindqvist E., Ogren S. O., Olson L. 2005. Increased phencyclidine-induced hyperactivity following cortical cholinergic denervation. *Neuroreport*, **16**: 1815.

Munoz F. J., Aldunate R., Inestrosa N. C. 1999. Peripheral binding site is involved in the neurotrophic activity of acetylcholinesterase. *Neuroreport*, **10**: 3621.

Schumacher M., Camp S., Maulet Y., Newton M., MacPhee-Quigley K., Taylor S. S., Friedmann T., Taylor P. 1986. Primary structure of acetylcholinesterase: implications for regulation and function. *Federation Proceedings*, **45**: 2976.

Soreq H., Seidman S. 2000. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature Review Neuroscience*, **2**: 294.

Thullbery M. D., Cox H. D., Schule T., Thompson C. M., George K. M. 2005. Differential localization of acetylcholinesterase in neuronal and non-neuronal cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, **96** (3): 599

Tsigelny I., Shindyalov I. N., Bourne P. E., Sudhof T. C., Taylor P. 2000. Common EF-hand motifs in cholinesterases and neuroligins suggest a role for Ca²⁺ binding in cell surface

associations. 2000. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, **9**: 180.

Woolf N., Butcher L. 1989. Cholinergic system: Synopsis of anatomy and overview of physiology and pathology: U *The Biological Substrates of Alzheimer's Disease*. New York: Academic Press, str. 73-86.

Đorđe Đorović

Delayed Effect of Perinatal Stress on Rat Brain Acetylcholine Esterase Activity

The effect of perinatal stress on rat brain acetylcholine esterase activity was determined in the synaptosomal and mitochondrial fractions of rat cortex and hippocampus. Stress was induced by separating the young rats from their mother on the ninth postnatal day, for a period of 24 h. The activity of acetylcholine esterase was measured spectrophotometrically according to Elman *et al.* (1961). The results demonstrate a significant difference in activity between the groups, in the mitochondrial fractions of cortex and hippocampus, as well as in the synaptosomal fraction of the hippocampus. This research confirms previous results and adds to the view that perinatal stress has a long-lasting effect which can be exhibited during adolescence.

