

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ «ОБЫЧНОЙ» И СВЕРХМАЛОЙ ДОЗ АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛА НА ХОЛИНЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ФРАКЦИИ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

Молочкина Е.М. , Трещенкова Ю. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН (ИБХФРАН), 119334, Россия, Москва, ул. Косыгина 4, E-mail: mol@sky.chph.ras.ru

Введение.

Одним из главных социально значимых заболеваний в настоящее время является болезнь Альцгеймера (БА). Основными дающими результат средствами терапии БА являются ингибиторы холинэстераз, позволяющие поддерживать в мозге уровень ацетилхолина, дефицит которого, развившийся в результате гибели холинергических нейронов, приводит к характерным для БА нарушениям – драматической потере когнитивных функций [1]. Поскольку решающую роль в патогенезе и развитии БА играет окислительный стресс [2, 4], для терапии и профилактики БА наиболее перспективным многие исследователи и врачи считают использование антиоксидантов. В течение ряда лет в различных клиниках производятся попытки включения в схемы лечения витамина Е, главным компонентом которого является природный антиоксидант альфатокоферол (ТФ). Однако, результаты такого рода испытаний весьма противоречивы, применение витамина Е часто не дает положительного эффекта [3, 4]. Одной из причин этого может быть его побочное действие, в частности, влияние на холинэстеразную активность. В литературе встречаются сведения о влиянии ТФ на активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) при введении его в организм. Следует отметить, что в этих работах ТФ использовали для влияния на эффект, обусловленный каким-либо воздействием на организм, приводящим к отрицательным последствиям, с целью их коррекции за счет действия ТФ как антиоксиданта [5, 6]. Несомненный интерес представляет изучение влияния ТФ как участника регуляции протекающих в клетке процессов на активность ацетилхолинэстеразы мозга при его введении в организм **интактных** животных. ТФ является необходимым компонентом биологических мембран. Он участвует в поддержании целостности (integrity) мембраны, в качестве эффективного антиоксиданта являясь участником системы гомеостаза ПОЛ, которая играет важную роль в регуляции клеточного метаболизма и функций [7]. Кроме того, ТФ может независимо от своего антиоксидантного действия влиять на структуру липидного бислоя [8, 9] и таким образом модифицировать деятельность локализованных в мембране функциональных белков.

Целью нашей работы было изучить влияние введенного *in vivo* интактным мышам ТФ на активность АХЭ, локализованной в мембранах нервных окончаний головного мозга мышей. Поскольку ТФ относится к веществам, оказывающим существенный эффект на разные биологические объекты в сверхмалых концентрациях [10], представляло интерес сравнить его действие в обычной и сверхмалой дозах (СМД).

Материалы и методы.

В работе использовали мышей линии Balb, самцов, массой 20-24 г. Альфа-токоферол (ТФ) (Serva) вводили в дозах 10^{-14} (сверхмалая) и 10^{-4} («обычная» физиологическая) моль/кг. ТФ для введения в обычной дозе растворяли в 0.5 % спирте (этанол высокой очистки фирмы «Merck»).

ТФ для введения в сверхмалой дозе готовили методом последовательного разбавления (1:100) спиртового раствора стерильной дистиллированной водой. Контрольным животным вводили дистиллированную воду или 0.5 % этанол. Препарат вводили внутривентриально за сутки до декапитации используемых для исследования животных.

Выделение и очистка синапсом и цитоплазматической фракции головного мозга мышей проводилась методом дифференциального центрифугирования [11]. Холинэстеразную (ХЭ) активность определяли спектрофотометрически по методу Элмана [12], используя ацетилтиохолин иодид (АТХ) (Serva) в качестве субстрата, с непрерывной регистрацией кинетики образования продукта реакции на спектрофотометре SP – Ultra (Россия). Ферментативную реакцию проводили в кювете спектрофотометра при

температуре 37°C, pH реакционной смеси = 8 (Трис-НСI буфер). Реакцию начинали добавлением субстрата. Кинетические параметры реакции гидролиза АТХ максимальную скорость V_{max} , кажущуюся константу Михаэлиса $K_{m каж}$, (далее- K_m) рассчитывали как параметры уравнения Михаэлиса-Ментен по кривой зависимости начальной скорости увеличения оптической плотности от концентрации ацетилтиохолина [13]. Скорость ХЭ-азной реакции определяли в области концентраций АТХ 0.15 – 4.0 мМ, включающей в себя участок характерного для ацетилхолинэстеразы (АХЭ) ингибирования «избытком» субстрата. Для исследованных нами объектов можно считать, что мы имеем дело с АХЭ (ЕС 3.1.1.7.), поскольку в головном мозге мышей содержание псевдохолинэстеразы (бутирилхолинэстеразы БХЭ) вообще очень мало, а в синапсомымах она практически отсутствует [14]. Зависимость скорости реакции от логарифма концентрации субстрата, которую мы получили, по форме близка к симметричному колоколу, характерному для АХЭ. Это подтверждает в нашем случае подавляющий вклад АХЭ в определяемую ХЭ активность, поскольку БХЭ не ингибируется субстратом, и зависимость при ее существенном содержании была бы несимметричной.

Содержание белка в препаратах синапсом определяли методом [15]. Для исследования действия ТФ на АХЭ *in vitro* использовали растворимый фермент (Sigma), выделенный из эритроцитов человека. Препарат содержит строму эритроцитов и поэтому рассматривается как мембраносвязанный.

Результаты и обсуждение.

При введении ТФ мышам в обеих дозах мы не обнаружили его влияния на холинэстеразную активность цитоплазматической фракции. Это видно из рисунка 1 и таблицы 1. Очевидно, что субстратные зависимости в опытных и соответствующих контрольных группах практически совпадают. Аппроксимируя левую возрастающую часть субстратной кривой уравнением Михаэлиса-Ментен, которому она хорошо подчиняется, мы рассчитали кинетические параметры реакции. Можно видеть хорошее совпадение их значений для опыта и контроля. Согласно данным по фармакокинетике [3], период полувыведения ТФ составляет 48 часов. В нашем случае декапитация мышей и выделение субклеточных фракций производились через 24 ч после инъекции препарата, то есть можно предполагать, что введенный ТФ еще присутствует в ткани мозга в концентрациях, соизмеримых с введенными дозами. Таким образом, можно считать, что ТФ не взаимодействует непосредственно с растворимой, не связанной с мембранами АХЭ цитоплазматической фракцией головного мозга и не влияет на ее активность. Не влияет он, по-видимому, и опосредованно на уровне, например, посттрансляционных модификаций или биосинтеза ферментного белка.

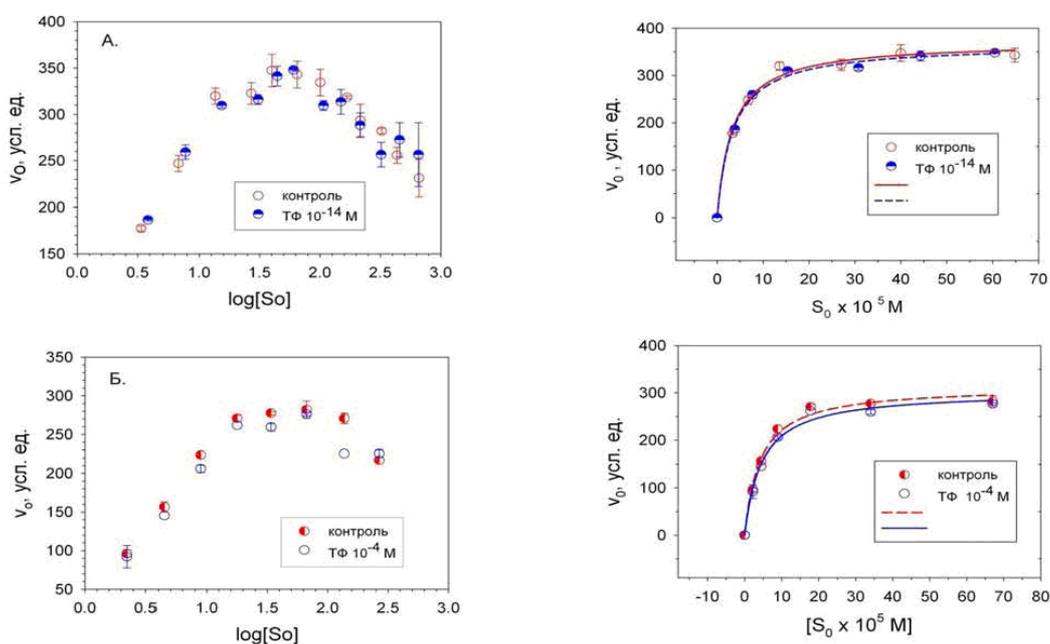


Рисунок 1. Отсутствие влияния введенного мышам альфа-токоферола в сверхмалой (10^{-14} моль/кг – А.) и «обычной» (10^{-4} моль/кг – Б.) дозах на холинэстеразную активность цитоплазматической

фракции головного мозга мышей. Слева – субстратная зависимость начальной скорости реакции от концентраций ацетилтиохолина (АТХ), включающих область характерного для АХЭ ингибирования «избытком» субстрата. Справа – аппроксимация «возрастающей» части субстратной зависимости гиперболой согласно уравнению Михаэлиса-Ментен. Каждая точка представляет среднее из 3 - 4 параллельных измерений скорости реакции \pm SE. Усл. ед. – прирост оптической плотности при длине волны 412 нм в мин, умноженный на 10^4 и отнесенный к концентрации белка в реакционной смеси (мг/мл).

Таблица 1. Кинетические параметры холинэстеразной реакции, катализируемой цитоплазматической фракцией головного мозга мышей, которым за 1 сутки до умерщвления вводили альфа-токоферол в дозах 10^{-14} и 10^{-4} моль/кг.

доза	Параметр	Km x 10^5 М	Vmax усл. ед.	Vmax/Km (эффективность)
контроль к 10^{-14} моль/кг		3.35 \pm 0.44	370 \pm 10	111 \pm 17
10 ⁻¹⁴ моль/кг		3.4 \pm 0.3	365 \pm 7	108 \pm 11
контроль к 10^{-4} моль/кг		4.2 \pm 0.6	314 \pm 11	75 \pm 13
10^{-4} моль/кг		4.5 \pm 0.6	303 \pm 10	67 \pm 11

Влияние ТФ на холинэстеразную активность фракции нервных окончаний (синапсом), которая обусловлена практически только активностью ацетилхолинэстеразы АХЭ (бутирилхолинэстераза содержится в мембранах мышечных синапсом в пренебрежимо малых количествах), было существенным. Это наглядно демонстрируется на рисунке 2 и в таблице 2. Следует отметить, что в отличие от действия на холинэстеразную активность цитоплазматической фракции мозга, 0.5% этанол, в котором вводили 10^{-4} моль/кг ТФ, сам по себе существенно не изменял активность мембраносвязанной АХЭ синапсом по сравнению с АХЭ мышей, которым вводили дистиллированную воду. Кинетические параметры фермента для этих контролей в случае синапсом были практически одинаковыми. Поэтому действие каждой из доз ТФ сравнивали с «объединенным» контролем.

Таблица 2. Кинетические параметры АХЭ синапсом головного мозга мышей, которым за 1 сутки до умерщвления вводили альфа-токоферол в дозах 10^{-14} и 10^{-4} моль/кг.

доза	Параметр	Vmax, усл. ед.	Km x 10^5 М	Vmax/Km (эффективность)	% ингибирования избытком субстрата*
контроль		338 \pm 21	3.4 \pm 1.6	98 \pm 49	53
10^{-14} моль/кг		382 \pm 1	0.90 \pm 0.04	424 \pm 17	17
10^{-4} моль/кг		478 \pm 2	2.8 \pm 0.1	171 \pm 6	40

Примечание * -отношение скорости реакции при $[S_0] = 4$ mM к Vmax в процентах.

При всех концентрациях субстрата для обеих доз препарата имела место значительная активация фермента. При аппроксимации левой (возрастающей) части субстратной зависимости гиперболой согласно уравнению Михаэлиса-Ментен и расчете кинетических параметров реакции выявлены их изменения. Оказалось, что при дозе 10^{-14} моль/кг почти в 4 раза уменьшена константа Михаэлиса Km при незначительно (хотя достоверно) (на 13 %) увеличенной максимальной скорости реакции V max. В случае дозы 10^{-4} моль/кг имело место увеличение максимальной скорости на 40% при не отличающейся от контроля Km. Отношение Vmax/Km (эффективность фермента), которое часто определяет скорость реакции при реальных физиологических концентрациях субстрата, в случае СМД ТФ возросло по сравнению с контролем более чем в 4 раза, в случае «обычной» дозы – примерно в 2 раза.

Одним из способов регуляции активности АХЭ (особенно это важно для передачи холинергических сигналов нейронами головного мозга) является способность этого фермента подвергаться ингибированию высокими концентрациями субстрата [16]. Не будь этой способности, передача соответствующего сигнала была бы невозможна, поскольку АХЭ является исключительно высоко эффективным ферментом, и нейромедиатор ацетилхолин подвергся бы деградации до попадания на рецептор. Субстратное ингибирование АХЭ обеспечивается взаимодействием субстрата с

соответствующим периферическим анионным сайтом на молекуле АХЭ [17].

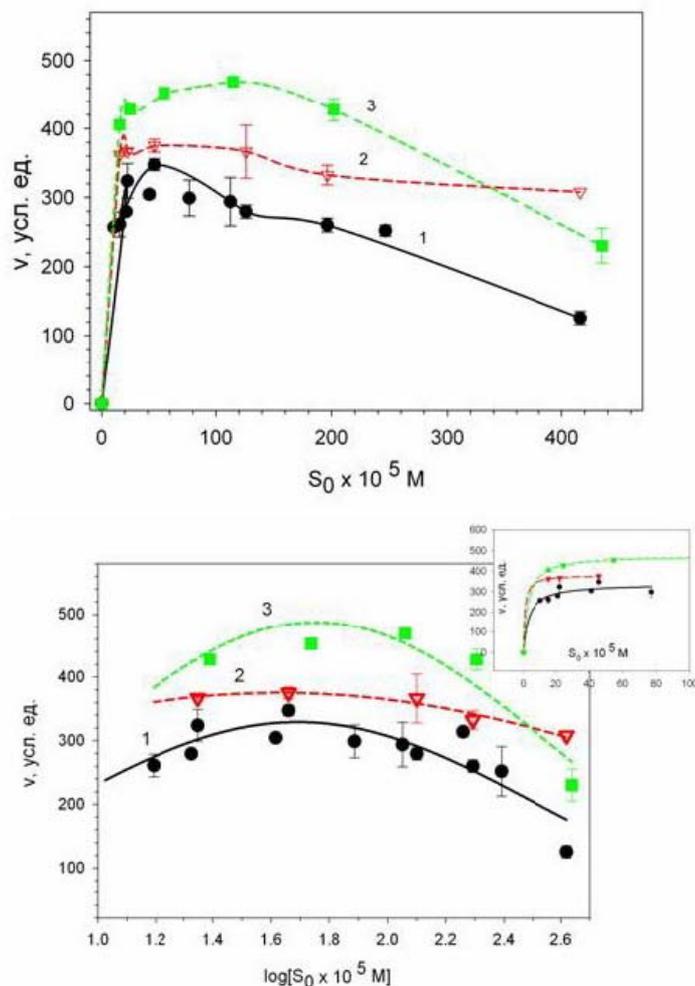


Рисунок 2. Зависимости скорости АХЭ-азной реакции синапсом (в «обычных» и полулогарифмических координатах) от концентрации субстрата, которые демонстрируют влияние альфа-токоферола в сверхмалой (10^{-14} моль/кг) и «обычной» (10^{-4} моль/кг) дозах на активность АХЭ фракции нервных окончаний (синапсом), выделенных из головного мозга мышей через сутки после введения препарата. 1 – контроль, 2 – доза 10^{-14} моль/кг, 3 – доза 10^{-4} моль/кг.

Наличие субстратного ингибирования АХЭ нервных окончаний хорошо видно на рисунке 2. Из рисунка и таблицы 2 также видно, что введенный мышам ТФ влияет на субстратное ингибирование АХЭ синапсом. В контроле процент ингибирования АХЭ-азной реакции при концентрации субстрата 4 мМ составляет порядка 50% по отношению к максимальной скорости, в случае дозы ТФ 10^{-4} моль/кг – порядка 40 %, для дозы 10^{-14} моль/кг – менее 20 %. Это говорит о возможной роли периферического анионного сайта фермента в активации АХЭ, вызванной токоферолом, и его большем вкладе при действии ТФ в СМД.

Следует отметить противоречивость литературных данных по влиянию ТФ на АХЭ при его введении *in vivo*. Имеются сведения как по активации [6, 18, 21], так и по ингибированию АХЭ [22, 23]. При этом и ингибирующее, и активирующее действие («нормализация») коррелируют с уменьшением уровня ПОЛ под действием ТФ. О связи уровня ПОЛ и активности АХЭ без влияния ТФ также имеются сведения противоположного характера – описано как уменьшение, так и увеличение активности АХЭ при усилении ПОЛ [20-23]. В модельных мембранных системах в широком диапазоне концентраций, включая СМД, ТФ только ингибировал ПОЛ в отличие от некоторых синтетических ингибиторов свободно-радикального окисления, которые могут и стимулировать ПОЛ [24]. К сожалению, в работах с введением ТФ *in vivo* часто для его солюбилизации используют твин-80, не ставя соответствующего контроля. Твин-80 оказывает довольно сильное ингибирующее действие на АХЭ мозга. Вводя мышам внутрибрюшинно его 0.5 % раствор, мы получили 50% падение холинэстеразной активности цитоплазматической фракции

мозга мышей (данные не опубликованы). Так что у нас есть некоторые основания не всегда доверять данным об ингибировании АХЭ при введении ТФ *in vivo*.

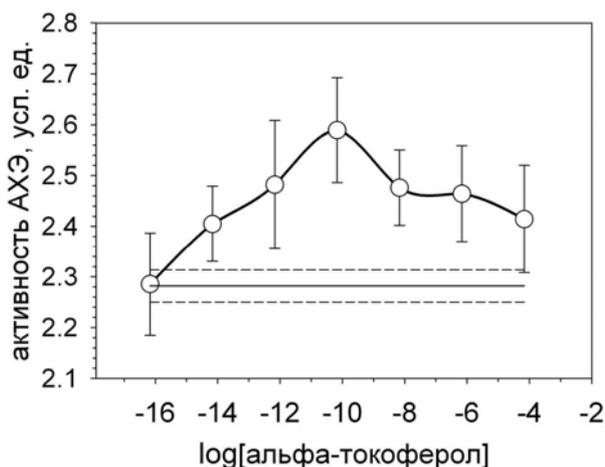


Рисунок 3. Влияние ТФ *in vitro* на активность растворимой эритроцитарной мембраносвязанной АХЭ. Мера активности - начальная скорость реакции при концентрации АТХ 0.8×10^{-3} М. Диапазон концентраций ТФ 10^{-16} - 10^{-4} М. ТФ добавляли в среду реакции в виде спиртового раствора. Конечная концентрация этанола - 0.5 %. Контрольные образцы содержали спирт в той же концентрации. Время инкубации реакционной смеси до добавления субстрата составляло 3 - 4 мин. Скорость реакции без добавления ТФ в присутствии и в отсутствие спирта не различались

Отсутствие влияния на растворимую цитоплазматическую АХЭ говорит о том, что ТФ не взаимодействует непосредственно с молекулами фермента мозга и таким способом не влияет на активность АХЭ. Он, по-видимому, не влияет также опосредованно на уровне организма на биосинтетический путь, на посттрансляционные процессы, регулирующие содержание разных молекулярных форм фермента.

Выраженный активирующий эффект введенного *in vivo* ТФ на скорость реакции, катализируемой мембранной АХЭ нервных окончаний головного мозга мышей, говорит о роли мембран в реализации его действия. Хочется подчеркнуть, что изменение структуры мембраны (может быть не структуры самой по себе, а тех параметров, компонентов, которые ее обеспечивают и которые важны для АХЭ) под действием ТФ, по-видимому, имеет значение и для взаимодействия субстрата и периферического анионного центра фермента, за счет которого осуществляется субстратное ингибирование.

Эффект ТФ может быть опосредованным через изменение обменных, биосинтетических процессов на уровне организма, от которых зависит состав и структура мембран и уровень ПОЛ. Поскольку к моменту взятия материала для исследования (24 ч после введения ТФ) ТФ еще не был выведен из организма (период полувыведения, как уже упоминалось выше, 48 ч), регуляция активности фермента может осуществляться и путем непосредственного изменения структуры липидного бислоя при взаимодействии ТФ с мембраной. При этом разное влияние на кинетические параметры говорит о преобладании различных механизмов действия при обычной и сверхмалой дозах препарата. Это, на наш взгляд, можно объяснить с точки зрения современных представлений о разных механизмах действия обычных доз и СМД токоферола на структуру мембран. Полученные нами результаты кажутся вполне соответствующими описанным в работах группы Н.П. Пальминой данным и представлениям об изменении структуры мембран под действием широкого диапазона концентраций ТФ [19]. Согласно этим данным в области традиционных «физиологических» концентраций (10^{-4} - 10^{-9} М) ТФ влияет на липидный бислой за счет его неспецифического встраивания в мембрану и взаимодействия с окружающими молекулами ФЛ; в области СМД (10^{-9} - 10^{-18} М) - преобладает вклад специфического связывания ТФ с лигандами на мембране. При этом по-разному могут быть затронуты компоненты, участвующие в регуляции активности АХЭ.

На рисунке 3 представлены результаты опытов по влиянию ТФ на активность растворимого фермента - АХЭ эритроцитов человека. Использовали продажный препарат (раствор) (фирмы Sigma), содержащий строму эритроцитов и считающийся препаратом мембраносвязанного фермента. Мерой активности служила начальная скорость реакции при концентрации субстрата 0.8×10^{-3} М.

Из рисунка 3 видно, что при действии ТФ *in vitro* в диапазоне концентраций 10^{-16} -

10^{-4} М на активность растворимой АХЭ эритроцитов имеет место некоторое, хотя и слабое, стимулирующее действие ТФ, наибольшее (порядка 15 %) - при концентрации ТФ 10^{-10} М. Условия эксперимента исключают существенное развитие ПОЛ в процессе определения активности АХЭ. Хотя известно, что при действии ТФ на ПОЛ в мембранах клеточных органелл он проявляет ингибирующее действие во всем диапазоне использованных и нами концентраций [24], мало вероятно, что его эффект на активность АХЭ в нашем случае опосредован влиянием на ПОЛ, защищающим фермент от действия продуктов окисления, тем более, что продукты окисления, как показано в некоторых работах [20], могут активировать АХЭ. Из работы группы Н. П. Пальминой по влиянию широкого диапазона концентраций ТФ на структуру плазматических мембран можно видеть, что даже краткое время инкубации суспензии мембран с ТФ (< 10 мин) приводит к достоверным изменениям в структуре липидного бислоя [19]. Однако нам кажется маловероятной связь эффекта с действием ТФ на структуру мембраны, поскольку область концентраций ТФ порядка 10^{-10} М, где у нас наблюдается максимальный эффект, является так называемой «мертвой» зоной [19], то есть областью концентраций, в которых ТФ не влияет на структуру мембраны. Поэтому мы допускаем, что стимуляция активности сосредоточенной в эритроцитах изоформы АХЭ под воздействием ТФ может объясняться непосредственным действием последнего на молекулу фермента.

Главным итогом нашего исследования является обнаружение значительного активирующего действия ТФ на мембраносвязанную АХЭ головного мозга при введении его в организм животных. Важно, что эффекты «обычной» и сверхмалой доз соизмеримы по величине.

Возможное активирующее действие ТФ на АХЭ может объяснить нередкое отсутствие положительного эффекта при использовании витамина Е как средства лечения болезни Альцгеймера.

THE EFFECT OF COMMONLY USED AND ULTRALOW DOSES OF ALPHA-TOCOPHEROL ON THE CHOLINESTERASE ACTIVITY OF MICE BRAIN SYNAPTOSOMES. A COMPARATIVE STUDY.

Molochkina E. M., Treschenkova Yu. A.

N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, E-mail:

mol@sky.chph.ras.ru

Литература.

1. Munoz-Torrero D. // Curr Med Chem. 2008, v. 15, # 24, p.2433-2455.
2. Sultana R., Butterfield D. // J Alzheimers Dis., 2010;19, # 1, p.341 - 353
3. Joshi Y. B., Pratico D. // Biofactors, 2012, v. 38, # 2, p. 90 – 97.
4. Pratico D. // Ann. N.Y. Acad. Sci., 2008, v.1147, p. 70 – 78.
5. Tiwari V., Kuhad A., Bishnoi M., Chopra C. // Pharmacology, Biochemistry and behavior. 2009, v. 93, p. 183 – 189.
6. Shadnia S., Dasgar M., Taghikhani S., Mohammadirad A., Khorasani R., Abdollahi M. // Toxicol. Mech. Methods, 2007, v. 17, # 2, p. 109 – 115.
7. Бурлакова Е.Б., в сб.: «Биохимия липидов и их роль в метаболизме клетки», М.: Наука, 1981, с.23.
8. Quinn P.J. // Biochemistry (Moscow), 2004, v. 69, # 1, p. 58-66.
9. Kagan V. E. // Ann. N. Y. Acad. Sci., 1988, v. 570, p. 120 – 135.
10. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. // Химическая физика, 2003, т.22, с. .21-40.
11. Прохорова М. И. // Методы биохимических исследований. , Л. ЛГУ, 1982, с. 273.
12. Ellman G. L., Courtney K.D., Andres V.Jr., and Featherstone R.M. // Biolchem. Pharmacol. 1961. N 7, p. 88 – 96.
13. Березин И. В. , Клесов А. А. // Практический курс химической и ферментативной кинетики. Изд. МГУ, М. 1976. 320 с.
14. Ballard C.G., Greig N.H., Guillozet-Bongaarts A.L., Enz A., Darvesh S.//Curr Alzheimer Res., 2005, v.2, #3, p.307-318.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Fare A. L., Randall R. J., // J.Biol. Chem. 1951.V.193. N1. P 265-275.

16. Reed M. C., Lieb F., Nijhout H. F. // *Bioessays*, 2010, v. 22, p. 422 – 429.
17. Rosenberry T., Mallender W. D., Thomas P. J. // *Chem. Biol. Interact.*, 1999, v.119-120, p. 85 – 97.
18. Schulpis K. H., Parthimos T., Tsakiris T., Parthimos N., Tsakiris S.// *Clin. Nutr.*, 2007, v.26, # 1, p.63 - 69.
19. Belov V. V., Maltseva E. L., Palmina N. P. // in: *Chemical reactions in Gas, solid and liquid phases. Synthesis, properties and application.*, Nova Publisher Inc., N. Y., 2011, Ch.4, p. 29 – 43.
20. Melo J. B., Agostino P., Oliveira C. R. // *Neurosci. Res.*, 2003, v. 45 # 1, p. 117 – 127.
21. Kaizer R.R., Correa M.C., Spanevello R.M., Morsch V.M., Mazzanti C.M., Goncalves J.F., Schetinger M.R.// *Inorg Biochem.* 2005, v. 99, # 9, p.1865-1870.
22. Thome G.R., Spanevello R.M., Mazzanti A., Fiorenza A.M., Duarte M.M., da Luz S.C., Pereira M.E., Morsch V.M., Schetinger M.R., Mazzanti C.M.// *Nicotine Tob Res.* 2011, v.13, # 12, p. 1210-1219.
23. Milatovic D., Ramesh C. Gupta R. C., Aschner M.// *The Scientific World Journal*, 2006, v. 6, p. 295 – 310.
24. Пальмина Н. П., Кледова Л. В., Панкова Т. В., Мальцева Е. Л., Белов В. В., Жерновков В. Е. // *Вопр. биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 2004, № 46с. 31 - 37.