

# Эффекты сверхмалых доз на разных уровнях организации биообъектов

УДК 577.325 + 577.15

## Модификация активности протеинкиназы С лигандами в сверхмалых концентрациях. Роль протеинкиназы С и ее эффекторов в процессах пероксидного окисления

Н. П. Пальмина, Е. Л. Мальцева, Е. И. Пынзарь, Е. Б. Бурлакова

*НАДЕЖДА ПАВЛОВНА ПАЛЬМИНА — доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН). Область научных интересов: мембранология.*

*117977 Москва, ул. Косыгина, 4, ИБХФ РАН, тел. (095)939-73-51, факс (095)137-41-01,  
E-mail npalm@sky.chph.ras.ru*

*ЕЛЕНА ЛЬВОВНА МАЛЬЦЕВА — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ИБХФ РАН. Область научных интересов: структура мембраны.*

*ЕЛЕНА ИВАНОВНА ПЫНЗАРЬ — кандидат биологических наук, сотрудник Института биологических исследований, г. Осака. Область научных интересов: липидология.*

К середине 90-х годов накопилось довольно много информации о чрезвычайно высокой чувствительности биологических объектов различной степени сложности к химическим и физическим факторам. Соответствующий эффект проявляется на уровне сверхмалых доз воздействия. Так, многие живые системы способны реагировать на присутствие биологически активных веществ — гормонов, пептидов, ядов, пестицидов, антиоксидантов и других агентов в концентрациях менее  $10^{-12}$  М [1–6].

В основном предшествующие наблюдения эффекта сверхмалых доз касались сложных биологических систем — от клеточных популяций и целостных организмов вплоть до биологических мембран [7–10]. Во всех этих объектах присутствуют системы вторичных посредников, способные многократно усиливать сигнал на сверхмалые воздействия. В связи с этим для подтверждения существования эффекта сверхмалых доз чрезвычайно важно было обнаружить его на молекулярном уровне, например, как проявление модификации активности фермента.

Для проведения соответствующих исследований, представленных в настоящей статье, в качестве объекта воздействия сверхмалых доз (СМД) был выбран фермент протеинкиназа С.

Протеинкиназа С, открытая Нишизукой и его коллегами [11–13], охарактеризована как  $Ca^{2+}$ -зависимый и липид-требующий фермент фосфатидилинозитного цикла. Протеинкиназа С фосфорилирует ряд мембраносвязанных и цитоплазматических белков [14, 15] и рассматривается как важнейшее звено в системе трансмембранной передачи физиологического сигнала при многих кратковременных и долговременных клеточных ответах, включая пролиферацию и трансформацию клеток [16–19].

Установлено, что нормальное функционирование большинства из одиннадцати изоформ протеинкиназы С требует присутствия фосфатидилсерина [17–22]. Важнейшим природным активатором протеинкиназы С является *sn*-7,2-диацилглицерол [11–17], некоторые ее изоформы испытывают стимулирующее влияние фосфатидилинозитолтрифосфата [23]. Фермент активируется и свободными ненасыщенными жирными кислотами, эффект наблюдается даже в отсутствие фосфатидилсерина и  $Ca^{2+}$ , хотя в их присутствии уровень активации выше [24, 25].

Эффекторами протеинкиназы С являются также лизофосфатидилхолины и их производные, которые в низких концентрациях активируют, а в высоких — ингибируют фермент [25, 26]; продукты гидролиза сфинголипидов — сфингозин и лизосфинголипиды обладают ингибирующим действием [27, 28].

### Влияние системы пероксидного окисления липидов на активность протеинкиназы С

Имеются указания на то, что процессы клеточной пролиферации и дифференцировки наряду с управляющим воздействием на них специфических регуляторов контролируются работой системы пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах [29, 30], поэтому представляло интерес изучить зависимость активности протеинкиназы С от концентрации первичных продуктов окисления фосфолипидов и арахидоновой кислоты (содержится в липидах) — диеновых конъюгатов [28].

Установлено, что первичные продукты окисления действуют как ингибиторы данного фермента. Обнаружена положительная кинетическая кооперативность ферментативной реакции по этим ингибиторам: ко-

эффицент Хилла (индекс кооперативности) составляет более единицы (соответственно 1,75 и более 4 для фосфолипидов и арахидоновой кислоты). Показано, что уравнение Хилла для ингибиторов выполняется в случае фосфолипидов и не соблюдается для арахидоновой кислоты. На примере последней определено, что повышение кооперативности (увеличение коэффициента Хилла) происходит при изменении степени окисленности в очень узком интервале (15–22%). Обнаружено, что сродство фермента к первичным продуктам окисления фосфолипидов различно: у продуктов окисления фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозита оно приблизительно в 2 раза выше, чем у фосфатидилсерина, что соответственно в 5–10 раз больше, чем к диеновым конъюгатам из арахидоновой кислоты.

Таким образом, первичные продукты окисления фосфолипидов и свободных ненасыщенных жирных кислот являются ингибиторами протеинкиназы С. Их взаимоотношения с ферментом носят характер положительной кинетической кооперативности, что свидетельствует о регуляторном действии этих веществ на фермент.

Выяснению вопроса о механизме ингибирующего эффекта посвящено несколько кинетических исследований [31–33], которые привели к заключению о том, что первичные продукты окисления липидов — диеновые конъюгаты являются ингибиторами протеинкиназы С смешанного типа. Очищенные гидропероксиды обладают свойством как ингибировать фермент в концентрациях, соответствующих концентрациям диеновых конъюгатов в фосфатидилсеринах, так и активировать его при воздействии в более высоких концентрациях ( $10^{-4}$  М) [28, 31, 34].

Приведенные выше данные позволяют рассматривать протеинкиназу С как пероксилипидзависимый фермент.

#### Действие природного антиоксиданта $\alpha$ -токоферола на протеинкиназу С

Одним из важнейших параметров системы регуляции ПОЛ в биологических мембранах является концентрация природных антиоксидантов [29, 30]. К наиболее эффективным природным антиоксидантам относится  $\alpha$ -токоферол (витамин Е), предотвращающий окисление липидов за счет взаимодействия со свободными радикалами и стабилизации структуры мембраны [35–37]. К началу наших работ были отдельные указания на то, что  $\alpha$ -токоферол может ингибировать протеинкиназу С [38, 39].

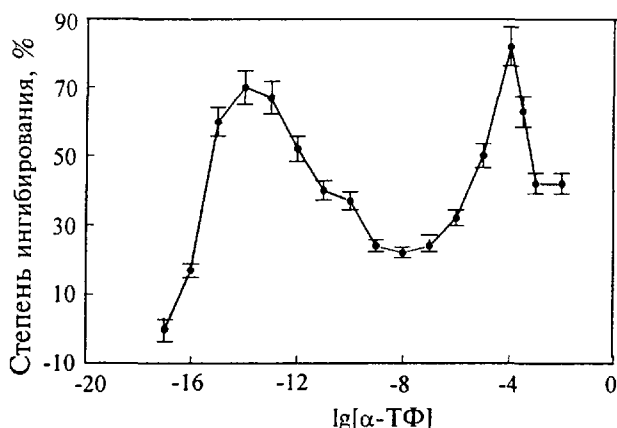


Рис. 1. Зависимость степени ингибирования протеинкиназы С от концентрации  $\alpha$ -токоферола [ $\alpha$ -ТФ]

Исследование влияния  $\alpha$ -токоферола на активность протеинкиназы С в широком интервале концентраций ( $10^{-17}$ – $10^{-2}$  М) в опытах *in vitro* позволило установить, что этот антиоксидант действительно является ингибитором данного фермента [40]. Зависимость активности фермента от концентрации  $\alpha$ -токоферола (рис. 1) имеет бимодальный характер с максимумами в областях концентраций  $10^{-11}$ – $10^{-15}$  М и  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  М, ингибирование фермента в этих областях составляет 60–80%. Результаты исследований при физиологических концентрациях ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М) совпадают с данными, приведенными в работах [38, 39].

Форма полученной кривой типична для закономерностей, описывающих действие веществ в СМД: максимум в области высоких концентраций, резкое снижение эффекта или его отсутствие («зона молчания») и второй максимум в области сверхмалых концентраций [41, 42].

С целью сравнения эффективности ингибирования протеинкиназы С в обычных, физиологических и сверхмалых дозах  $\alpha$ -токоферола был проведен расчет кинетических параметров фермента на основании экспериментальной зависимости его активности от концентрации субстрата гистона Н-1 в присутствии  $10^{-4}$  и  $10^{-14}$  М антиоксиданта [31, 33]. Анализ полученных данных (см. таблицу) позволяет дать оценку влияния  $\alpha$ -токоферола в широком интервале концентраций на эффективность (каталитическую активность) протеинкиназы С. Положительная кинетическая кооперативность наблюдается только в случае низких концентраций эффектора ( $10^{-14}$  М) — коэффициент Хилла составляет 1,7, т.е. превышает 1. При

Таблица

#### Кинетические параметры протеинкиназы С при действии $\alpha$ -токоферола *in vitro*

Параметры: коэффициент Хилла (по субстрату)  $n_H$ ; показатели сродства фрагмента к субстрату [ $S_{0,5}$ ] — концентрация субстрата (лиганда), связанного на 50% ферментом, и константа Михаэлиса (кажущаяся)  $K_{M(каж)}$ ; максимальная скорость реакции  $V_{макс}$  ( $V_{макс}^0$  — без эффектора,  $V_{макс}^{инг}$  — в присутствии препарата); мольное соотношение компонентов реакции протеинкиназа С :  $\alpha$ -токоферол : фосфатидилсерин, ПКС :  $\alpha$ -ТФ : ФС

Концентрация эффектора, М	$n_H$	$[S_{0,5}], K_{M(каж)},$ мкМ	$V_{макс},$ $10^{-12}$ моль/(мг · мин)	$V_{макс}^0 / V_{макс}^{инг}$	ПКС : $\alpha$ -ТФ : ФС
Контроль	1,0	$0,08 \pm 0,01$	1700	—	1 : 0 : 300
$10^{-4}$	1,0	$0,17 \pm 0,03$	240	7	1 : 4000000 : 300
$10^{-14}$	$1,9 \pm 0,2$	$0,081 \pm 0,04$	320	5	2500 : 1 : 800000

высоких концентрациях ( $10^{-4}$  М) и в отсутствие эффектора коэффициент Хилла равен 1, следовательно, в этих случаях кинетическая кооперативность не осуществляется. Сродство фермента к субстрату в зависимости от концентрации  $\alpha$ -токоферола различно: константа Михаэлиса  $K_{M(\text{как})}$  при концентрации антиоксиданта  $10^{-4}$  М в два раза больше величины  $[S_{0,5}]$ , характеризующей сродство к ферменту в случае проявления кинетической кооперативности при концентрации  $\alpha$ -токоферола  $10^{-14}$  М, и константы  $K_M$  для реакции в отсутствие антиоксиданта.

Таким образом, сверхмалая концентрация антиоксиданта не изменяет сродства фермента к субстрату, в то время как высокая доза уменьшает его в два раза. Высокая доза ингибитора более существенно, чем низкая, снижает максимальную скорость реакции фосфорилирования (в 7 и 5 раз, соответственно).

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что  $\alpha$ -токоферол в высоких концентрациях действует как ингибитор смешанного типа, а в сверхмалых концентрациях как аллостерический эффектор. Более того, в качестве регулятора фермента он более эффективен в сверхмалых концентрациях благодаря положительной кинетической кооперативности с коэффициентом Хилла, близким к 2, и в два раза большему сродству протеинкиназы С к гистону Н-1. Иными словами, сверхмалые дозы  $\alpha$ -токоферола увеличивают чувствительность фермента к субстрату. Согласно расчету молярное соотношение компонентов реакции фосфорилирования — протеинкиназы С,  $\alpha$ -токоферола и фосфатидилсерина составляет для концентраций антиоксиданта-ингибитора  $10^{-4}$  и  $10^{-14}$  М 1: 4000000 : 300 и 2500 : 1 : 800000, соответственно, т.е. в случае сверхмалой концентрации  $\alpha$ -токоферола одна его молекула воздействует на 2500 молекул фермента.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что  $\alpha$ -токоферол в широком спектре концентраций является ингибитором протеинкиназы С и меняет кинетические параметры фермента.

#### Действие синтетического антиоксиданта фенозана на протеинкиназу С

В качестве эффектора протеинкиназы С был исследован также синтетический антиоксидант из класса экранированных фенолов\*. Фенозан — сильный антиоксидант, имеющий высокую антирадикальную активность и обладающий широким спектром биологического действия [43].

Было изучено влияние фенозана (калиевая соль) на активность протеинкиназы С в нормальных и опухолевых клетках, растущих в культуре, т.е. в условиях, приближенных к *in vivo*. В качестве биологических моделей были выбраны гладкомышечные клетки аорты крыс (VSMC), на которых ранее был показан эффект  $\alpha$ -токоферола [38, 39, 44], и клетки остеосаркомы человека (Saos-2), характеризующиеся ярко выраженными опухолевыми свойствами. Антиоксидант вводили в клеточные культуры в концентрации от  $10^{-4}$  до  $10^{-20}$  М. Действие данного антиоксиданта сравнивали с влиянием наиболее сильного активатора протеинки-

\* Работа выполнена в лаборатории проф. А. Ацци (Институт биохимии и молекулярной биологии, Университет, г. Берн, Швейцария) Е. Л. Мальцевой совместно с д-ром Д. Боскобойником.

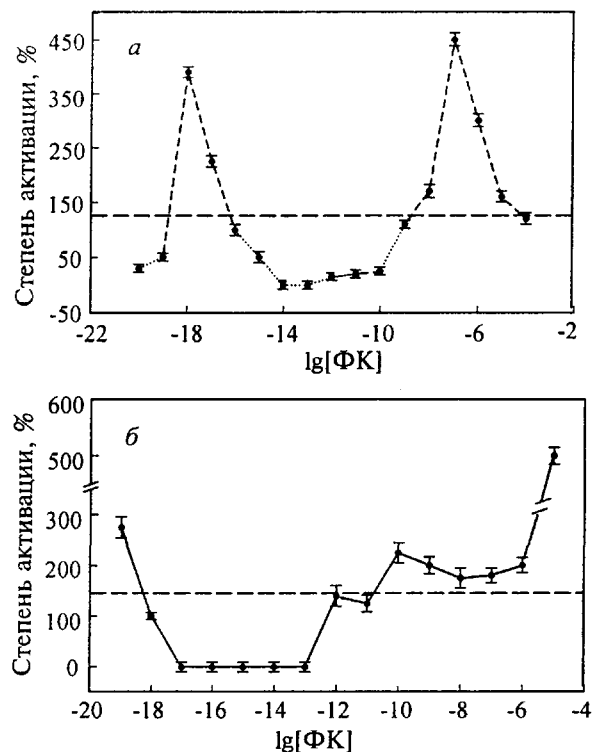


Рис. 2. Зависимость степени активации протеинкиназы С от концентрации фенозана (калиевая соль) [ФК], добавленного к гладкомышечным клеткам аорты крыс (а) и к опухолевым клеткам остеосаркомы человека (б), растущим в культуре.

Штриховая кривая — действие форболового активатора

назы С — 12-*o*-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата в эффективной его концентрации —  $10^{-7}$  М [45].

Обнаружено, что фенозан действует как активатор протеинкиназы С. Зависимость изменения активности фермента от концентрации фенозана, добавленного к культуре клеток VSMC, носит ярко выраженный бимодальный характер, два острых максимума соответствуют концентрациям  $10^{-7}$  и  $10^{-18}$  М (рис. 2а).

Степень активации фермента при этих концентрациях фенозана приблизительно одинакова и составляет 400%. Между максимумами находится «зона молчания», которая охватывает примерно пять порядков концентрации эффектора: от  $10^{-10}$  до  $10^{-14}$  М. В данной концентрационной области активность протеинкиназы С близка к базальной. Стимулирующий эффект активатора сравнения значительно ниже и составляет ~ 170%.

Таким образом, фенозан в концентрациях  $10^{-7}$  и  $10^{-18}$  М по своему эффекту значительно превосходит известный форболовый активатор протеинкиназы С и может рассматриваться как суперактиватор данного фермента.

По отношению к опухолевым клеткам Saos-2 кривая «доза-эффект» подобна бимодальной в интервале концентраций от  $10^{-4}$  до  $10^{-9}$  М (рис. 2б). При этом степень активации фермента составляет 500% при самой большой из исследованных концентраций —  $10^{-4}$  М и 300% при сверхмалой его концентрации —  $10^{-19}$  М. Необходимо отметить, что в случае опухолевых клеток была обнаружена не просто «зона молчания», а «мертвая зона», в пределах которой активность фермента равна нулю. Эта зона лежит в интервале концентраций фенозана от  $10^{-13}$  до  $10^{-17}$  М. Кроме

того, между «мертвой зоной» и максимумом при большой концентрации антиоксиданта ( $10^{-10}$ – $10^{-6}$  М) имеется область с относительно высокой и стабильной активностью фермента.

Отмеченные различия в характере дозовых зависимостей активности протеинкиназы С возможно связаны с тем, что одна из культур используемых клеток является опухоловой. Именно для опухолевых клеток такая растянутая по шкале концентраций кривая предсказана в математической модели клеточного цикла, основанной на анализе изменений физико-химических параметров плазматических мембран нормальных и опухолевых клеток [46].

Таким образом, в действии синтетического и природного антиоксидантов на протеинкиназу С обнаруживается, с одной стороны, аналогия дозовых зависимостей — бимодальный характер с максимумами в области обычных, физиологических и сверхмалых доз, с другой стороны, противоположный знак проявляемого эффекта:  $\alpha$ -токоферол ингибирует фермент, а фенозан стимулирует его активность.

Соответственно возникает вопрос, почему продукты пероксидного окисления липидов и антиоксидант  $\alpha$ -токоферол являются ингибиторами, а антиоксидант фенозан проявляет свойства суперактиватора фермента. Пока мы не можем ответить на такой вопрос, это предмет для дальнейшего изучения. Но на данный момент установлена принципиальная возможность модуляции активности протеинкиназы С антиоксидантами в сверхмалой дозе — чрезвычайно важный факт, свидетельствующий о том, что эффект СМД может проявляться и на простых системах на молекулярном и клеточном уровнях.

#### Действие форболового активатора протеинкиназы С на систему пероксидного окисления липидов мембран эндоплазматического ретикулума

Известно, что форболовые эфиры являются активными модуляторами систем вторичных посредников, которые локализованы в клеточной мембране [47–49]. Для некоторых из них, например, 12-*o*-тетрадеканоилфорбол-13-ацетата (ТФА), протеинкиназа С является рецептором, а сам ТФА эффективно активирует фермент [50, 51]. Поскольку, как показано выше, концентрация антиоксидантов и состав липидов биологических мембран имеют существенное значение для проявления протеинкиназой С своей активности, а также для функционирования локализованных в них рецепторов [52, 53], представляется важным изучение вопроса о возможном влиянии форболовых эфиров на систему пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах, регулируемую именно эти свойства.

Действие форболового эфира было исследовано в широком спектре концентраций ( $10^{-3}$ – $10^{-16}$  М). Установлено [54], что ТФА ингибирует процесс ПОЛ; дозовая зависимость степени ингибирования (рис. 3) носит экстремальный характер с максимумом при  $10^{-13}$ – $10^{-9}$  М, т. е. при весьма низких концентрациях.

Известно, что субстратом ПОЛ в биомембранах являются фосфолипиды, а именно, входящие в их молекулу ненасыщенные жирные кислоты. Способность смеси липидов к окислению определяется во многом степенью их ненасыщенности, отсюда следует

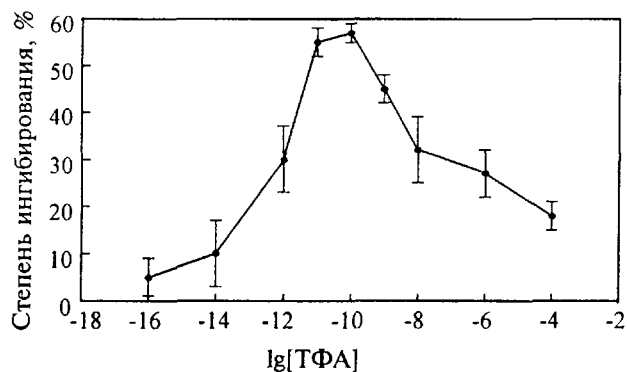


Рис. 3. Зависимость степени ингибирования пероксидного окисления липидов мембран эндоплазматического ретикулума от концентрации форболового эфира [ТФА]

также, что по мере окисления доля ненасыщенных липидов уменьшается. Действительно, в процессе ПОЛ происходит резкое снижение количества двойных связей на 1 мг липидов, а добавление ТФА тормозит этот процесс. Константы скорости расщепления ненасыщенного субстрата, вычисленные в работе [54], составляют в контроле и в присутствии  $10^{-12}$  М ТФА соответственно  $4,46 \cdot 10^{-2}$  и  $1,7 \cdot 10^{-2}$  мин<sup>-1</sup>, т. е. различаются более, чем в два раза.

Существенное влияние на константу скорости расщепления ненасыщенного субстрата характерно для веществ, изменяющих структурную организацию липидов и таким образом воздействующих на скорость радикальных стадий инициирования, продолжения и обрыва цепи. В связи с этим было исследовано изменение микровязкости липидной компоненты плазматических мембран клеток печени под влиянием ТФА *in vitro*. Для картирования мембраны были использованы три иминоксильных стабильных радикала (зонды I, II, III), локализованных в различных областях липидного бислоя мембраны [55].

На рис. 4 приведены кривые изменения времени вращательной корреляции  $\tau_c$  зондов I, II, III (имеющего смысл времени переориентации зонда на угол  $\pi/2$ ) в зависимости от концентрации форболового эфира. Видно, что под действием этого агента  $\tau_c$  зондов I и II возрастает, а зонда III уменьшается. Наибольшие отклонения от нормы обнаруживаются в области концентраций от  $10^{-15}$  до  $10^{-10}$  М для зондов I, II и от  $10^{-15}$  до  $10^{-8}$  М для зонда III.

Аналогичные данные были получены при исследовании влияния ТФА в сверхмалых концентрациях на микровязкость липидного бислоя при использовании в качестве зондов двух диоксильных стабильных радикалов с различной длиной жирнокислотной цепи [56]. Во всех случаях максимальный эффект наблюдался при сверхмалых концентрациях ТФА.

Таким образом, форболовый эфир является для плазматической мембраны модификатором двойного действия: под его влиянием поверхностные слои липидов (локализация зондов I и II) становятся более жесткими, а более гидрофобные области липидов (локализация зонда III) увеличивают свою текучесть. Подобное изменение в структурной организации мембраны может отразиться как на параметрах пероксидного окисления липидов, так и на взаимодействии протеинкиназы С с мембраной.

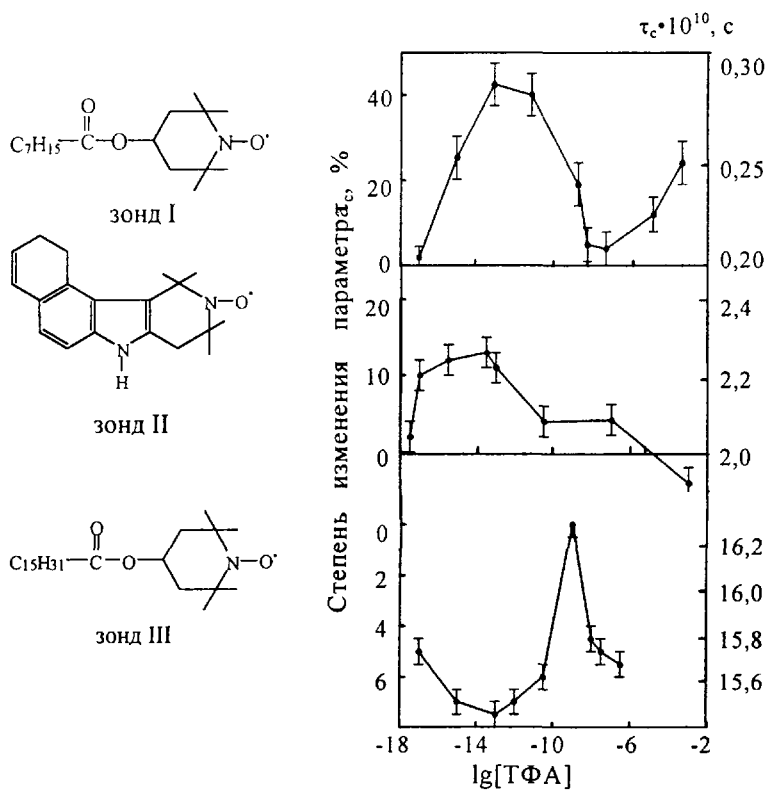


Рис. 4. Изменение времени вращательной корреляции  $\tau_c$  спиновых зондов I, II, III в плазматических мембранах клеток печени в зависимости от концентрации форболового эфира

Необходимо подчеркнуть, что ТФА ингибирует окисление липидов только в биомембранах. Проведение аналогичных модельных экспериментов — окисление метилового эфира олеиновой кислоты [54] при 37° С при скорости зарождения свободных радикалов, сопоставимой с таковой в микросомальных липидах [ $1,27 \cdot 10^{-10}$  моль/(л · с)], показало, что ТФА в интервале концентраций  $10^{-14}$ — $10^{-3}$  М не влияет на окисление и, следовательно, не проявляет свойств антиоксиданта. Аналогичные данные были получены ранее в работах В. Е. Кагана, с сотр. [57, 58], которые обнаружили действие ТФА на неферментативное окисление в микросомах печени, в то время как в модельных опытах на липосомах из липидов, выделенных из тех же самых мембран, эффект отсутствовал.

Таким образом, на основании результатов наших экспериментов и литературных данных можно сделать вывод, что ТФА ингибирует ПОЛ в мембранах эндоплазматического ретикулаума. Отличительными чертами этого ингибитора как антиоксиданта являются проявление ингибирующей активности в сверхмалых концентрациях, на 4—10 порядков ниже, чем используемых в практике жидкофазного окисления антиоксидантов, и отсутствие воздействия на окисление в модельных системах (метилолеате и липосомах). Форбол-дидеканоат (ДДФ), структурный аналог ТФА, не обладает подобными свойствами и вообще не влияет на процесс окисления.

Совокупность перечисленных выше качеств, а также опубликованные данные о том, что точно такими же свойствами обладает ганглиозид  $GM_1$  (из класса гликолипидов) [59, 60], дают основания полагать, что эффективным действующим началом является, вероятно, не само исходное вещество (ТФА или  $GM_1$ ), а их комплексы с рецепторами, находящимися на мембра-

не. Известно, что ТФА рецепторно взаимодействует с мембраносвязанной протеинкиназой С [61]. Можно полагать, что образующийся комплекс затем вступает в реакции окисления.

#### Действие форболового эфира и протеинкиназы С на систему пероксидного окисления липидов в плазматических мембранах клеток мозга *in vitro*

С целью проверки высказанного выше предположения о механизме действия форболового активатора на ПОЛ было проведено изучение эффекта при совместном введении *in vitro* ТФА и протеинкиназы С в систему окисления (клеточные мембраны). Поскольку при выработке клеточного сигнала лиганд связывается с рецепторами, расположенными на плазматической мембране, исследовали процесс ПОЛ в плазматических мембранах клеток мозга с использованием протеинкиназы С, выделенной из тех же мембран, в широком спектре концентраций, а также при совместном введении обоих агентов [62]. Показано, что во всей области исследованных концентраций ( $10^{-17}$ — $10^{-7}$  М) ТФА вызывает антиокислительный эффект. Неактивный в биологическом отношении аналог ТФА — ДДФ антиокислительное действие не проявляет. Степень торможения окисления составляла более 20% во всех случаях, средний ингибирующий эффект равен 40—45%, максимальный — 65%. Отметим, что эти значения превышают соответствующие характеристики, полученные при исследовании свойств

ТФА на микросомальных мембранах клеток печени, где средняя степень ингибирования составила не более 25—30%, а максимальная — 50% [55].

Зависимость «доза-эффект» для мембран клеток мозга имеет два статистически достоверных ( $P < 0,05$ ) максимума при  $10^{-15}$  и  $10^{-12}$  М (рис. 5, кривая 2).

Таким образом, концентрационная зависимость эффекта ТФА на ПОЛ в плазматических мембранах

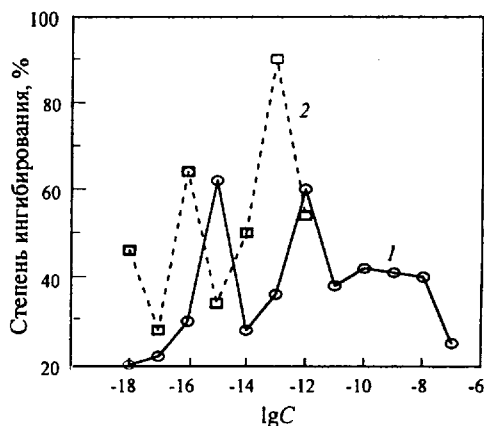


Рис. 5. Зависимость степени ингибирования пероксидного окисления липидов в плазматических мембранах клеток мозга от концентрации форболового эфира ТФА (1) и протеинкиназы С (2)

Степень ингибирования оценивали по накоплению первичных продуктов окисления — диеновых конъюгатов

клеток мозга отличается от аналогичной кривой, полученной для микросомальных мембран печени, которая имеет только один максимум [55].

Более высокая ингибирующая активность ТФА к плазматическим мембранам клеток мозга может быть связана с тем, что активным действующим началом, как полагают в работах [55, 57], является комплекс ТФА с рецептором — протеинкиназой С, содержание которой в плазматических мембранах клеток мозга выше, чем в мембранах эндоплазматического ретикула печени [63].

Для оценки справедливости этого предположения мы провели эксперименты по выяснению характера действия протеинкиназы С на ПОЛ, а также ТФА и фермента совместно, причем в экспериментах была использована протеинкиназа, выделенная в четырех независимых экспериментах из тех же плазматических мембран мозга, на которых изучался процесс ПОЛ. Оказалось, что концентрационная зависимость степени ингибирования ПОЛ под действием протеинкиназы С, как и в случае ТФА, носит бимодальный характер (рис. 5, кривая 2) с двумя статистически достоверными максимумами ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем или близлежащими точками при концентрациях фермента  $10^{-13}$  и  $10^{-16}$  М. Средний уровень ингибирования — 48%, максимальный — 90%, что превышает соответствующие значения для форболового активатора.

Совместное действие протеинкиназы С в концентрации  $10^{-16}$  М и ТФА в концентрации  $10^{-12}$  М, (ингибирующих ПОЛ при раздельном использовании на 65%), привело к значительно большему торможению окисления, чем следовало бы ожидать, исходя из аддитивности антиокислительных свойств этих агентов. Оценка влияния этих веществ на ПОЛ по периоду индукции  $\tau$  на соответствующих кривых накопления диеновых конъюгатов показала, что при совместном введении агентов эффект значительно превышает аддитивный.

Эти данные позволяют сделать вывод о синергетическом эффекте протеинкиназы С и форболового эффектора в сверхмалых дозах на ПОЛ в плазматических мембранах клеток мозга. В связи с этим возникает весьма важный вопрос о том, действуют ли фермент и его активатор на ПОЛ как независимые химические агенты или они образуют активный комплекс. Из экспериментальных данных следует, что протеинкиназа С способна тормозить ПОЛ в отсутствие форболового активатора, в то время как относительно ТФА определенно ответить на этот вопрос довольно трудно, так как в мембранах всегда присутствует протеинкиназа С; на окисление в липосомах ТФА не влияет [57].

Наблюдаемое явление синергизма при совместном присутствии протеинкиназы С и активатора скорее склоняет к предположению об образовании между ними комплекса, обладающего большими антиокислительными свойствами, чем исходные вещества. В пользу этого предположения свидетельствуют и полученные нами данные об отсутствии эффекта при использовании аналога ТФА — ДДФ: известно, что из-за стерических препятствий ДДФ такого комплекса не образует и поэтому не активирует протеинкиназу С [64]. Есть сообщения о принципиальной возможности образования комплекса ТФА с протеинкиназой С, в его формировании может участвовать фосфатидилсерин, содержащийся в мембране [65, 66].

В общем, полученные нами результаты и литературные данные не исключают возможности действия исследуемых веществ на ПОЛ по второму механизму, однако при данном подходе в полной мере трудно объяснить действие форболового активатора в сверхмалых концентрациях. Для возможности реализации этого механизма эффективность комплекса должна быть выше эффективности отдельно взятого вещества на несколько порядков.

#### Анализ биологических эффектов под действием лигандов протеинкиназы С

На примере протеинкиназы С впервые удалось установить, что антиоксиданты — природный ( $\alpha$ -токоферол) и синтетический (фенозан) — проявляют в действии СМД и на молекулярном уровне. Отметим, что еще для двух ферментов обнаружен эффект снижения активности под влиянием лигандов в СМД в системах *in vitro*: это ацетилхолинэстераза [67, 68] и простагландин-Н-синтетаза [69]. Важно отметить, что в качестве лигандов в обоих случаях использовались вещества, модифицирующие систему пероксидного окисления липидов. На примере протеинкиназы С и  $\alpha$ -токоферола впервые продемонстрировано, что на активность фермента сверхмалая доза регулятора может действовать эффективнее, чем физиологическая его концентрация.

В эффектах, вызванных  $\alpha$ -токоферолом и фенозаном, есть сходства и различия. Природный антиоксидант —  $\alpha$ -токоферол является довольно сильным ингибитором протеинкиназы С. Синтетический антиоксидант — фенозан, активирующий протеинкиназу С в очищенном виде [69], действует как суперактиватор фермента, находящегося в плазматических мембранах нормальных и опухолевых клеток, растущих в культуре. В этой связи еще раз подчеркнем, что как показали эксперименты, активирующее влияние фенозана значительно выше действия известного форболового стимулятора активности протеинкиназы С и опухолевого промотора [45, 63, 64].

Наряду с противоположным знаком направленности эффектов этих антиоксидантов и с различиями в способах их действия на фермент обнаруживается аналогия их дозовых зависимостей, которые в общих чертах совпадают с типом зависимости «доза—эффект», полученной на других биологических объектах при исследовании действия разнообразных биологически активных веществ [7, 8, 41, 42, 55, 62]. Это проявляется, во-первых, в определенном типе бимодальных зависимостей с характерными максимумами и в наличии «зоны молчания», а также в существовании острого максимума при высоких дозах как природного, так и синтетического антиоксиданта.

Различия в характере дозовых зависимостей выявляются прежде всего между нормальными и опухолевыми клетками, для последних обнаруживается так называемая «промежуточная зона» (между максимумом воздействия при высоких концентрациях фенозана и «мертвой зоной»), в которой эффект антиоксиданта достаточно высок. Мы связываем наличие такой области с особенностями регуляции активности протеинкиназы С в опухолевых клетках, что может дать новые подходы к разработке принципов и схем химиотерапии опухолей с помощью синтетических антиоксидантов. Кроме того, исследования убедительно показали, что такой активатор протеинкиназы С как

форболовый эфир ТФА, рецепторно взаимодействующий с ферментом, обладает способностью ингибировать ПОЛ в сверхмалых дозах как в мембранах эндоплазматического ретикулума, так и в плазматических мембранах. Сам фермент в СМД также оказывает антиоксидантное действие на ПОЛ. Эти экспериментальные факты, а особенно наличие синергизма при совместном использовании протеинкиназы С и форболового активатора в СМД наводят на мысль о тесной связи ПОЛ и модификацией активности фермента под действием сверхмалых доз лигандов.

Вполне естественно возникает вопрос о возможном механизме наблюдаемого явления. Предложено несколько основных механизмов, объясняющих существование феномена эффекта СМД в принципе [8, 42, 70-74]. Не останавливаясь подробно на этих механизмах, отметим лишь, что имеющиеся теоретические положения, объясняющие эффект СМД, можно подразделить на общие, такие как гипотеза Л.А. Блюменфельда о параметрическом резонансе [72], представления о роли структуры растворителя, как например воды [74] в данном явлении, и более частные — наличие высокоэффективных систем усиления сигнала, формирование ответа в условиях неравновесного связывания лиганда с рецептором. Одним из механизмов увеличения чувствительности к лиганду может быть кинетическая кооперативность его связывания с ферментом [42, 71].

Обсуждая концентрационные закономерности действия антиоксидантов в СМД на активность протеинкиназы С, а также ее форболового стимулятора, ганглиозида  $GM_1$  и влияния самого фермента на систему ПОЛ, следует отметить, что все эти вещества либо сами являются рецепторами протеинкиназы С, либо имеют рецептор на мембране ( $\alpha$ -токоферол, фенозан, форболовый эфир). Поэтому в качестве предпочтительного механизма можно принять гипотезу Зайцева—Сазанова [71] о существовании нескольких (в простейшем случае двух) рецепторов, с которыми связывается лиганд. Рецепторы имеют различные константы перехода из начального состояния в активное (и обратно) и действуют в противоположных направлениях. Расчеты скорости проявления общего эффекта как разности эффектов, вызванных связыванием СМД вещества на разных рецепторах, выявляют существование бимодальной зависимости с максимумом для СМД биологически активных веществ. Эти положения и наши экспериментальные результаты хорошо согласуются с представлениями, развитыми в работе [42] об аллостерическом взаимодействии каталитических центров в молекуле фермента или рецептора, причем эти центры имеют существенно разное сродство к субстрату: малые дозы лиганда преимущественно связываются с высокоаффинным каталитическим центром. При увеличении дозы в реакцию включается второй центр, который аллостерически взаимодействует с первым, понижая его сродство к субстрату и вызывая тем самым «сход» с него молекул лиганда.

Другой аспект механизма эффекта СМД изучаемых лигандов связан с их антиоксидантными свойствами. Здесь необходимо также иметь в виду, что исследуемые вещества (ТФА, протеинкиназа С) избирательно концентрируются в липидах. В пересчете на липиды их действующие концентрации возрастают на три порядка. Тогда антиоксидантный эффект в интервале концентраций  $10^{-5}$ — $10^{-10}$  М ( $10^{-2}$ — $10^{-7}$  М в расчете на липиды) может быть объяснен в рамках свойств

обычных антиоксидантов. Действие лигандов в области концентраций  $10^{-11}$ — $10^{-14}$  М ( $10^{-8}$ — $10^{-11}$  М на липиды) может быть связано с так называемым структурным фактором: вещества модифицируют вязкостные свойства липидов, препятствуя развитию процесса пероксидного окисления липидов [35]. Такими способностями обладает форболовый активатор, причем максимальный эффект наблюдался именно для интервала концентраций  $10^{-11}$ — $10^{-14}$  М [55, 56]. Следовательно, и антиокислительные свойства активатора в этой области концентраций могут быть объяснены изменением структуры липидного бислоя, лишь для объяснения эффекта в интервале более низких концентраций ( $10^{-11}$ — $10^{-14}$  М в липидной фазе) требуется принципиально новый подход.

Совокупность данных — проявление протеинкиназой С антиокислительных свойств только в активном функциональном состоянии (потеря этих свойств после инактивации); отсутствие влияния форболового активатора на систему ПОЛ в искусственных безбелковых системах (метилолеат, липосомы); синергетическое действие этого активатора на ПОЛ — приводит к заключению о том, что протеинкиназа С наряду со своими основными функциями (катализ фосфорилирования белков) обладает дополнительно свойствами «антиокислительного» фермента, а активатор ТФА в интервале сверхмалых концентраций действует опосредованно через протеинкиназу С. Отсутствие в инкубационной среде АТФ исключает возможность реализации механизмов, связанных с фосфорилированием и последующей активацией известных «антиокислительных» ферментов типа супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы.

Можно высказать и некоторые весьма умозрительные предположения относительно молекулярного механизма проявления протеинкиназой С свойств «антиокислительного» фермента. Известно, что регуляторный домен этого фермента содержит богатые цистеином цинксодежащие участки («цинковые пальцы»), ответственные, в частности, за связывание форболовых эфиров [75, 76]. Строение этих участков весьма сходно со структурой каталитических центров «антиокислительных» ферментов, например супероксиддисмутазы, содержащей ионы  $Cu^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  [77]. Возможно, регуляторный домен протеинкиназы С обладает свойством катализировать антиокислительные процессы, чем и объясняется ингибирующее ПОЛ действие данного фермента в отношении пероксидного окисления липидов. Безусловно, это предположение носит сугубо гипотетический характер и требует основательной экспериментальной проверки.

По-видимому, во взаимодействие форболового активатора с протеинкиназой С вносят вклад две компоненты: специфическая — под влиянием ТФА активируются «антиокислительные» свойства фермента и неспецифическая. Вторая компонента возникает в результате влияния активатора на структуру мембраны (микровязкость липидного бислоя) таким образом, что создаются благоприятные условия для перехода дополнительных молекул протеинкиназы С из цитозоля в мембрану и закрепляется конформационное состояние фермента, которое наиболее выгодно для взаимодействия с субстратом и эффектором; указания на такую возможность есть в работе [78]. Обе компоненты, взаимодействуя синергетически, увеличивают активность протеинкиназы С и ее антиокислительные способности.



Результаты, полученные в работе, убедительно показывают существование эффекта СМД не только на системах повышенной сложности, но и на уровне молекулярных взаимодействий. В связи с этим общие факторы, обуславливающие данное явление, следует, вероятно, искать в области парадоксальных физико-химических изменений во взаимодействии молекулы со средой, в которой протекает реакция. И здесь полезно привлечь теории, связанные со структурой воды и ее «памятью», получившие развитие в последние годы. В частности, существует представление, подтвержденное некоторыми экспериментальными данными, о кластерных образованиях в воде, которые, согласно мнению авторов [74], способны менять физико-химические свойства воды и скорость химических и биохимических процессов, в ней протекающих.

Мы склоняемся к предположению о том, что растворение лигандов в воде вызывает изменение соотношения существующих в воде кластеров и/или приводит к формированию дополнительных структур, которые ранее отсутствовали. Затем эти структуры при последующих разбавлениях создают свои реплики, которые и определяют проявление свойств введенной ранее примеси. Иными словами, если растворение примеси вызвало изменение свойств воды как растворителя, то разбавляется уже не примесь, а сама вода. Вероятно, разработка данного научного направления весьма перспективна и приведет к разгадке феноменального явления эффекта сверхмалых доз.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бурлакова Е. Б., Греченко Т. Н., Соколов Е. Н., Терехова С. Ф. Биофизика, 1986, т. 31, с. 921—923.
- Богатыренко Т. Н., Редкозубова Г. П., Конрадов А. А., Бурлакова Е. Б. Там же, 1989, т. 34, с. 327—329.
- Ашмарин И. П., Лелекова Т. В., Санжиева Л. Ц. Изв. АН, 1992, т. 4, с. 531—536.
- Торchieva I. N., Erokhin V. N., Osipova S. V. Biomed. Sci., 1991, v. 2, p. 41—47.
- Гладышева Т. Б., Конрадов А. А., Лебедев К. А. Биофизика, 1989, т. 34, с. 833—834.
- Zaitsev S. V., Khegai L. A., Kim B. V. e. a. Immunol. Lett., 1992, v. 32, p. 27—30.
- Бурлакова Е. Б. Вест. РАН, 1994, т. 64, с. 425—431.
- Ашмарин И. П., Каразеева Е. П., Лелекова Т. В. Нейроиммунология, эпидемиология и интерферонология рассеянного склероза. С.-П.: Лики России, 1996, с. 29—34.
- Бурлакова Е. Б., Бойков П. Я., Папина Р. И., Карцев В. Г. Изв. АН, Сер. биол., 1996, с. 39—45.
- Efanov A. M., Koshkin A. A., Sazanov L. A. e. a. FEBS Lett., 1994, v. 335, p. 114—116.
- Takai Y., Kishimoto A., Inoue M., Nishizuka Y. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, p. 3603—3610.
- Nishizuka K. Mol. Biol., Biochem. and Biophys., 1980, v. 32, p. 113.
- Nishizuka K. Trends Biochem. Sci., 1983, v. 8, p. 13—17.
- Newton A. C. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1993, v. 22, p. 1—12.
- Takai Y., Kaibuchi K., Tsuda T., Hoshijima J. Cell. Biochem., 1985, v. 29, p. 143—149.
- Nishizuka Y. J. Amer. Med. Assoc., 1989, v. 262, p. 1826.
- Protein kinase C, current concepts and future perspectives. Eds.: D. S. Lester, R. M. Epand. N.-Y., London, Toronto, Sydney, Tokyo, Singapore: Ellis Horwood, 1992, p. 216.
- Azzi A., Boscoboinik D., Hensey C. Eur. J. Biochem., 1992, v. 208, p. 547—549.
- Protein kinase C. Ed. J.-F. Kuo, N.-Y.: Oxford University Press, 1994, p. 223.
- Dekker L. V., Parker L. J. Trends Biochem. Sci., 1994, v. 19, p. 73—77.
- Hug H., Scare T. P. J. Biochem., 1993, v. 291, p. 329—332.
- Bell R. M., Burns D. I. J. Biol. Chem., 1991, v. 266, p. 4661.
- Nishizuka Y. Science, 1992, v. 258, p. 607—609.
- Murakami K., Routtenberg A. FEBS Lett., 1985, v. 192, p. 189—191.
- Segiguchi K., Tsukada M., Ogita K. e. a. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, v. 145, p. 797—806.
- Berdel W. E., Anderssen R., Munder P. G. Phospholipids and Cellular Regulation. Ed. J. F. Kuo, v. 2. Boca Raton: CRC Press, 1985, p. 41—64.
- Wise B. C., Raynor R. L., Kuo J. F. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, p. 694—699.
- Мальцева Е. Л., Курнакова Н. В., Бурлакова Е. Б., Пальмина Н. П. Биохимия, 1990, т. 50, с. 471—478.
- Burlakova Ye. B., Palmina N. P., Maltseva Ye. L. In: Membrane Lipid Oxidation III. Ed.: C. Vigo-Pelfrey, Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 209—238.
- Kagan V. E., Bakalova R. A., Karakashev P. Ibid., p. 191—208.
- Maltseva E. L., Kurnakova N. V., Palmina N. P., Burlakova E. B. J. Chem. and Biochem. Kinetics, 1991, v. 1, p. 93—108.
- Maltseva E. L., Kurnakova N. V., Palmina N. P. Abstrs 22-th FEBS Meeting, Stockholm, Sweden, 1993, p. 153.
- Пальмина Н. П., Мальцева Е. Л., Бурлакова Е. Б. Хим. физика, 1995, т. 14, с. 47—60.
- O'Brian C. A., Ward N. E., Weinstein I. B. e. a. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988, v. 155, p. 1374—1376.
- Бурлакова Е. Б., Крашаков С. А., Храпова Н. Г. Биол. мембраны, 1998, т. 15, с. 137—167.
- Kagan V. E. Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1989, v. 570, p. 121—135.
- Shamovsky I. L., Yarovskaya I. Y. J. chim. phys. et phys.-chim. biol., 1991, v. 88, p. 2675—2680.
- Machoney C. W., Azzi A. Biochim. Biophys. Res. Commun., 1988, v. 154, p. 694—696.
- Boscoboinik D., Szewczyk A., Hensey C., Azzi A. J. Biol. Chem., 1991, v. 266, p. 6188—6191.
- Пальмина Н. П., Мальцева Е. Л., Курнакова Н. В., Бурлакова Е. Б. Биохимия, 1994, т. 52, с. 193—203.
- Delikonstantinos G., Kopeikina-Tsiboukidon L., Villiton K. Biochem. Pharm., 1987, v. 36, p. 1153—1157.
- Burlakova Ye. B., Konradov A. A., Khudyakov I. Nonlinear Biol., 1991, v. 1, p. 77—82.
- Pobedimsky D. G., Burlakova E. B. Atmospheric Oxidation and Anti-oxidants. North-Holland, Elsevier, 1993, v. 3, p. 223.
- Azzi A., Boscoboinik D., Chatelain E. In: Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications. Basel, Birkhauser Verlag, 1992, p. 123—132.
- Kraft A. S., Anderson W. B. Nature, 1983, v. 301, p. 621—625.
- Chernavskii D. S., Palamarchuk E. K., Polezhaev A. A. e. a. Biosystems, 1977, v. 9, p. 187—199.
- Nishizuka Y. Science, 1992, v. 258, p. 607—614.
- Nishizuka Y. J. Amer. Med. Assoc., 1989, v. 262, p. 1826.
- Berridge M. J., Irvine R. Nature, 1984, v. 312, p. 315—321.
- Rana R. S., Hokin L. E. Physiol. Rev., 1990, v. 37, p. 17167.
- Jaken S. Meth. Enzymol., 1987, v. 41, p. 275—287.
- Belokoneva O. S., Maltseva E. L., Zaitsev S. V., Palmina N. P. J. Chem. and Biochem. Kinetics., 1992, v. 2, p. 183—193.
- Afaneri I. A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1990, v. 166, p. 1365—1371.
- Пынзарь Е. И., Богданова Н. Г., Пальмина Н. П. Биол. мембраны, 1995, т. 12, с. 279—287.
- Пальмина Н. П., Богданова Н. Г., Мальцева Е. Л., Пынзарь Е. И. Там же, 1992, т. 9, с. 810—820.
- Мальцева Е. Л., Пальмина Н. П. Там же, 1992, т. 9, с. 1023—1025.
- Kagan V. E., Bakalova R. A., Serbinova E. A. e. a. In: Free Radicals: Chemistry, pathology and medicine. London: Richelien Press, 1988, p. 417—438.
- Kagan V. E. In: Lipid Peroxidation in Biomembranes. Boca Raton: CRC Press, 1988, p. 225.
- Tyurin V. A., Tyurina Yu. Yu., Avrova N. F. Neurosci. Internat., 1992, v. 20, p. 401—407.
- Tyurina Yu. Yu., Tyurin V. A., Avrova N. F. Mol. and Chem. Neuropath., 1993, v. 19, p. 205—207.
- Slaga T. I., Fisher S. M., Nelson K., Glenson G. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 3659—3663.
- Пальмина Н. П., Пынзарь Е. И., Курнакова Н. В., Бурлакова Е. Б. Биол. мембраны, 1997, т. 14, с. 376—384.



63. Leli U., Hauser G., Froimowitz M. *Pharmacol.*, 1990, v. 37, p. 286—295.
64. Da Silva C., Fan X., Martelly J., Castanga M. *Cancer Res.*, 1990, v. 50, p. 2081—2087.
65. Myung-Ho Lee, Bell R.M. *J. Biol.Chem.*, 1989, v.264, p.14797.
66. Молочкина Е.М., Озерова И.Б. Тез. 2-го Межд. симп. «Механизмы действия сверхмалых доз». Москва, 1995, с. 101.
67. Озерова И.Б., Молочкина Е.М. Там же, с. 102.
68. Сергеева М.Г., Гончар М.В., Намгаладзе Д.А. и др. *Биохимия*, 1997, т. 62, с. 216—222.
69. Хохлов А.П., Ярыгин К.Н., Бурлакова Е.Б. *Биол. мембраны*, 1989, т. 6, с. 133—141.
70. Blumenfeld L.A., Grosberg A.Yu., Tikhonov A.N. *J. Chem.Phys.*, 1991, v. 95, p. 7541—7547.
71. Сазанов Л.А., Зайцев С.В. *Биохимия*, 1992, т. 57, с. 1443.
72. Блюменфельд Л.А. *Биофизика*, 1993, т. 38, с. 129—132.
73. Koshland D.E. *Biochemistry*, 1988, v. 27, p. 5829—5834.
74. Lo S.Y. In: *Physical, Chemical and Biochemical Properties of Stable Water (I<sub>E</sub><sup>TM</sup>) Clusters*, Singapore, World Scientific Publishing Co Ptc. Ltd., p 3-47.
75. Bell R.M., Burns D.J. *J. Biol.Chem.*, 1991, v. 266, p. 4661.
76. Ono Y., Fujii T., Igarashi K. e. a. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1989, v. 86, p. 4868—4871.
77. Tainer J.A., Getzoff E.D., Beem K.M. e. a. *J. Mol. Biol.*, 1982, v. 160, p.181—217.
78. Lester D.S. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, v. 1, p. 297—303.

УДК 577.325 + 577.15

## Действие фенозана и экзогенного ацетилхолина на ацетилхолинэстеразу и систему липидной пероксидации в мембранах клеток головного мозга

Е. М. Молочкина, И. Б. Озерова, Е. Б. Бурлакова

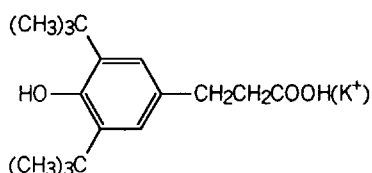
ЕЛЕНА МИХАЙЛОВНА МОЛОЧКИНА — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института биохимической физики (ИБХФ) им. Н. М. Эмануэля РАН. Область научных интересов: мембранология, нейрехимия.

117334 Москва, ул. Косыгина 4, корп. 11, ИБХФ РАН, тел. (095)939-73-51, факс (095)137-41-01, E-mail mol@chph.ras.ru

ИРИНА БОРИСОВНА ОЗЕРОВА — научный сотрудник ИБХФ РАН. Область научных интересов: мембранология, нейрехимия.

К настоящему времени установлено, что сверхмалые дозы (СМД) биологически активных веществ и физических факторов (излучения) действуют на биологические системы самого разного уровня организации — от макромолекул, надмолекулярных комплексов, клеток, органов и тканей до растительных и животных организмов и целых популяций [1—5]. Спектр агентов, действующих в СМД, как и список объектов, по отношению к которым установлена эффективность сверхмалых воздействий, все более расширяется.

В настоящей статье дан обзор результатов изучения влияния сверхмалых доз синтетического антиоксиданта фенозана



и важнейшего для организма нейромедиатора ацетилхолина на активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и на уровень пероксидного окисления липидов мембран клеток головного мозга [6—9]. Объектами воздействия исследуемых веществ были индивидуальный фермент — растворимая АХЭ и мембраны, выделенные из клеток головного мозга мышей, представляющие собой надмолекулярные структуры. При этом воздействию фенозана и ацетилхолина подвергали *in vitro* мембраны клеток мозга интактных животных, а также исследо-

вали мембраны, выделенные из мозга мышей, которым препарат вводили *in vivo* внутрибрюшинно, т.е. изучали проявление действия на целый организм.

Интервал используемых концентраций веществ был таков, что на  $10^6$  молекул фермента ацетилхолинэстеразы приходилось от 1 до  $10^4$  молекул изучаемых эффекторов фермента в области СМД и  $10^{11}$ — $10^{10}$  молекул в области обычных концентраций.

### Изучение влияния фенозана на активность ацетилхолинэстеразы

Эксперименты *in vitro* с растворимой АХЭ. Экспериментальные данные, представленные на рис. 1а, характеризуют влияние фенозана К (калиевая соль) на кинетические параметры водорастворимой кристаллической АХЭ: на максимальную скорость ферментативного гидролиза  $V_{\max}$  субстрата ацетилтиохолина и константу Михаэлиса  $K_M$ , а также на эффективность фермента, выражаемую отношением  $V_{\max}/K_M$ . Видно, что под действием фенозана оба параметра  $K_M$  и  $V_{\max}$  изменяются, причем эти изменения однонаправлены. Случай, когда  $V_{\max}$  и  $K_M$  изменяются под действием эффектора фермента однонаправленно, но в разной степени, означает, что в зависимости от концентрации субстрата будет проявляться либо ингибирующее, либо активирующее воздействие на фермент.

В наших экспериментах наблюдается уменьшение эффективности фермента  $V_{\max}/K_M$ , т.е. параметра, определяющего, согласно уравнению Михаэлиса—