

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_ETM) 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

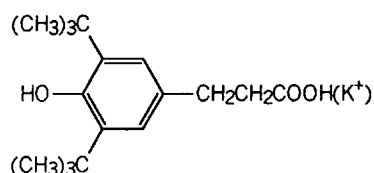
ЕЛЕНА МИХАЙЛОВНА МОЛОЧКИНА — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института биохимической физики (ИБХФ) им. Н. М. Эмануэля РАН. Область научных интересов: мембранология, нейрехимия.

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 исследу-

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—

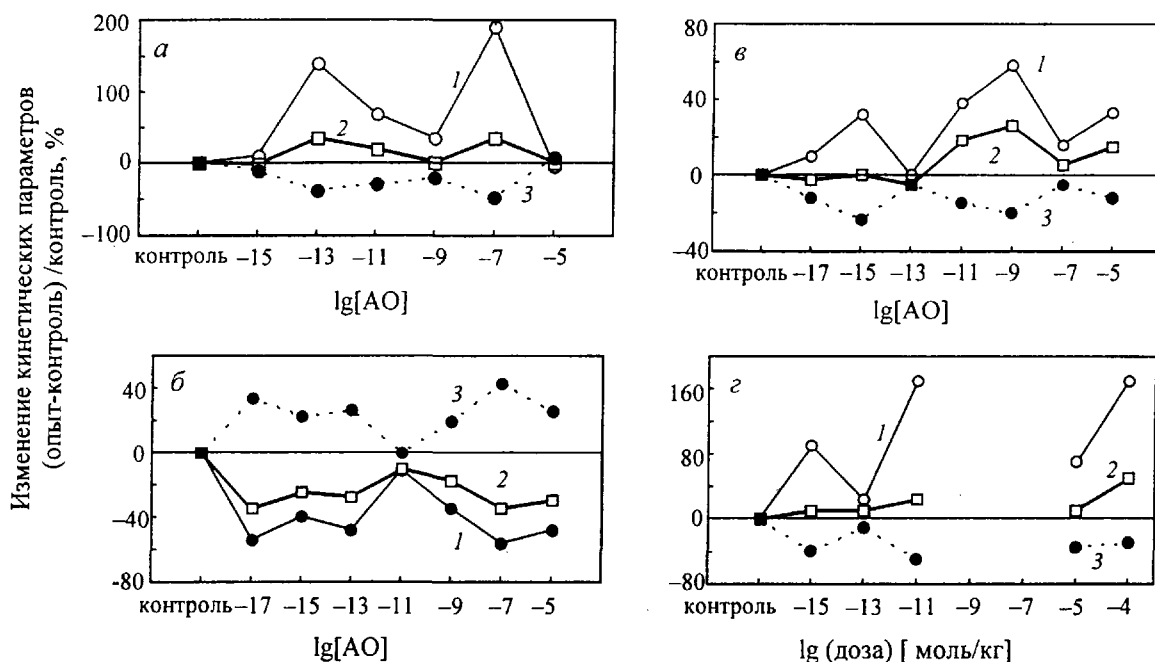


Рис. 1. Влияние фенозана К на кинетические параметры ацетилхолинэстеразы:

1 — константа Михаэлиса K_M ; 2 — максимальная скорость гидролиза V_{\max} ; 3 — V_{\max}/K_M .

а — введение антиоксиданта (АО) в среду реакции, катализируемой растворимой АХЭ; б — введение АО в среду реакции, содержащей мембранные фракции; в — включение АО в мембраны путем преинкубации суспензии мембран клеток головного мозга мышей с этанольным раствором АО при 4 °С в течение 20 ч. Концентрация спирта 0,5%, концентрация мембран по белку при инкубации 4 мг/мл. По оси абсцисс — [АО] в преинкубируемой суспензии, концентрация фенозана и белка в среде реакции в 155 раз меньше; г — внутрибрюшинное введение мышам фенозана К с выделением через 1 ч мембранной фракции АХЭ головного мозга.

Ментен, его активность при малых концентрациях ацетилхолина, в том числе при «реальных» физиологических, в основном за счет увеличения K_M .

Концентрационная зависимость изменений кинетических параметров имеет два максимума, соответствующих концентрациям, различающимся на шесть порядков. Изменения в области высоких доз и СМД фенозана соизмеримы по величине. По виду зависимости эффекта фенозана К по отношению к АХЭ от его концентрации сходны с типичными кривыми, описывающими действие веществ в сверхмалых дозах, для которых характерны максимум в области относительно высоких концентраций, затем снижение или отсутствие эффекта («зона молчания») и другой максимум в области сверхмалых концентраций [3, 10].

В ранее проведенных исследованиях было установлено [11–13], что как представитель природных антиоксидантов α -токоферол, так и синтетический антиоксидант из группы экранированных фенолов фенозан, используемые *in vitro* в сверхмалых концентрациях (10^{-19} – 10^{-11} М), оказывают соизмеримое с действием обычных доз влияние на активность протеинкиназы С — ключевого фермента клеточной сигнализации, который играет важную роль в регуляции роста и размножения клеток, в трансформации нормальных клеток в опухолевые, в промоции опухолевого роста.

Обнаружено, что в некоторых случаях фенозан К оказывает на этот фермент влияние, значительно превосходящее эффект форболовых эфиров — известных модуляторов протеинкиназы С [12]. С важной регуляторной ролью протеинкиназы С связан тот факт, что она не функционирует как индивидуальный фермент, а работает как надмолекулярная система в совокупно-

сти с целым комплексом эффекторов. В наших экспериментах впервые продемонстрировано влияние сверхмалых концентраций фенозана К на индивидуальный кристаллический фермент, который принципиально отличается по своим свойствам и функциям от протеинкиназы С. Следовательно, можно предположить, что найденная ранее для протеинкиназы С способность изменять свою ферментативную активность под действием сверхмалых количеств антиоксидантов не связана с особенностями этого фермента как сложной надмолекулярной системы, а представляет собой общее явление, отражающее, возможно, одну из сторон функции антиоксидантов как регуляторов клеточного метаболизма.

Эксперименты *in vitro* с мембраносвязанной АХЭ.

Для разработки новых средств, направленных на лечение патологий центральной нервной системы, в том числе связанных с нарушениями памяти, важно изучение действия препаратов на мембраносвязанную АХЭ, которая является лимитирующим звеном в поддержании уровня ацетилхолина в мозге, необходимого для его нормальной деятельности.

На рис. 1б представлены кривые изменения кинетических параметров АХЭ фракции мембран клеток головного мозга мышей, полученные при введении в среду реакции фенозана К. Видно, что под действием антиоксиданта, как и в случае растворимого фермента, параметры K_M и V_{\max} изменяются однонаправленно. При этом эффективность фермента V_{\max}/K_M имеет выраженную тенденцию к увеличению (в основном, за счет уменьшения K_M). Здесь, как и при действии фенозана на растворимый фермент, в зависимости от концентрации субстрата может проявляться либо ин-

гибирующее, либо активирующее действие антиоксиданта. Судя по изменению эффективности фермента, при концентрациях субстрата, соответствующих реальному содержанию ацетилхолина в головном мозге, должна проявляться некоторая активация мембранного фермента.

Зависимость эффекта от концентрации фенозана не является монотонной. В исследованной нами области концентраций наблюдаются два максимума (хотя и размытых): в области сверхмалых концентраций 10^{-17} — 10^{-13} M и в области обычных концентраций 10^{-9} — 10^{-5} M , которые разделены относительно узкой зоной нулевого эффекта.

Сравнение полученных данных с показателями действия фенозана на растворимый фермент выявляет следующие особенности наблюдаемых эффектов. Сходство заключается во влиянии фенозана главным образом на константу Михаэлиса K_M и в наличии максимумов эффекта, разделенных «зоной молчания». Различия проявляются в форме этих максимумов, а главное — в направлении эффекта: если в случае растворимого фермента его эффективность уменьшается за счет увеличения K_M , то эффективность фермента, связанного с мембранами клеток головного мозга, увеличивается за счет уменьшения K_M . Этому отвечает соответственно ингибирование и активация АХЭ при концентрациях субстрата, близких к физиологическим. Поскольку нами использовался растворимый фермент (производство Пермского института вакцин и сывороток) эритроцитарного происхождения, мы склонны объяснить наблюдавшиеся отличия различием молекулярных форм фермента.

При функционировании мембраносвязанного фермента нельзя полностью исключить и опосредованных через мембрану изменений липидного микроокружения, определяющего в той или иной степени конформацию молекулы фермента. В нашем случае описываемый этап эксперимента проводился в условиях, не предполагающих существенного включения препарата в липидную фазу мембран — фенозан использовали в виде водорастворимой формы (калиевая соль) и вводили его в среду реакции без предварительной инкубации суспензии мембран в присутствии антиоксиданта. Тем не менее, мембрана может сыграть свою роль. Антиоксидант может связываться с определенными сайтами (рецепторами?) на мембране, тем самым индуцируя в ней структурные изменения и соответственно изменения конформации, а, следовательно, и кинетических свойств фермента, локализованного в «сопряженных» с этими сайтами областях мембраны. Отметим, что имеются сведения об изменении структуры мембран (микровязкости липидного бислоя) под действием СМД обладающих антиоксидантными свойствами форболовых эфиров [14, 15] и фенозана [16].

Если обеспечить предварительное включение фенозана (более гидрофобной его формы — кислоты) в мембраны клеток мозга путем преинкубации суспензии мембран со спиртовым раствором вещества, то обнаруживается уменьшение эффективности фермента (опять, в основном, за счет изменения K_M) (рис. 1в). И в этом случае наблюдается немонотонная концентрационная зависимость с максимумами, которые соответствуют различающимся на шесть порядков концентрациям фенозана.

Введение препарата *in vivo*. На рис. 1а представлены кинетические параметры АХЭ мембранной фракции, выделенной из головного мозга мышей через 1 ч после внутрибрюшинного введения животным фенозана. Препарат вводили в обычных «терапевтических» дозах — 10^{-5} и 10^{-4} моль/кг веса животных и в сверхмалых дозах 10^{-15} , 10^{-13} и 10^{-11} моль/кг. Мышей забивали через 1 ч после введения препарата. Такой срок обусловлен тем, что в течение этого периода происходят существенные сдвиги в состоянии липидной фазы синапсом головного мозга животных и изменения активности центральной холинергической системы при введении обычных доз фенозана К [17].

Как следует из рис. 1з, в области обычных доз в значительной степени увеличивается константа Михаэлиса K_M для мембраносвязанной АХЭ, что приводит к достоверному уменьшению эффективности фермента, т.е. к ингибированию активности АХЭ в области концентраций субстрата, соответствующих реальному содержанию ацетилхолина в головном мозге.

Введение мышам фенозана К в двух из исследованных нами сверхмалых доз 10^{-15} и 10^{-11} моль/кг вызывает соизмеримое с действием обычных доз увеличение K_M и соответственно ингибирование активности фермента. Промежуточная доза 10^{-13} моль/кг не оказывает эффекта.

Результаты, приведенные на рис. 1, показывают, что по направленности действие фенозана К на мембранную АХЭ противоположно при введении его *in vitro* в среду реакции и *in vivo* в организм животных, а именно, в первом случае ферментативная активность увеличивается, во втором — уменьшается (через 1 ч после внутрибрюшинного введения). В то же время обнаруживается сходство в действии фенозана (которое проявляется в увеличении K_M и уменьшении эффективности АХЭ) при введении этого антиоксиданта *in vivo* и при включении его в липидный бислой мембраны *in vitro*. Это может свидетельствовать о том, что антихолинэстеразное действие фенозана *in vivo* обусловлено включением его в липидную фазу мембраны. Интересно, что определенное сходство имеет место при действии фенозана на мембраносвязанную АХЭ *in vivo* и на растворимый фермент *in vitro* (ингибирование). Однако мы считаем, что не следует искать аналогий в механизме действия фенозана в этих случаях, поскольку имеем дело с разными молекулярными формами ацетилхолинэстеразы.

Для оценки длительности действия антиоксиданта нами было проведено измерение кинетических параметров АХЭ, связанной с мембранами нервных окончаний клеток головного мозга мышей, через 2 суток после введения сверхмалой дозы фенозана К. Для сравнения изучали эффект обычной дозы антиоксиданта. По истечении этого промежутка времени после введения обычных доз фенозана К он не обнаруживается в мозге (во всяком случае в количествах, соизмеримых с введенной дозой). Как видно из рис. 2а, обычная доза фенозана практически не вызывает изменения кинетических параметров синапсомальной АХЭ. В случае введения $3 \cdot 10^{-14}$ моль/кг антиоксиданта выявлены изменения K_M и V_{\max} — оба параметра увеличиваются, причем в одинаковой степени, в ~1,5 раза. Эффективность же фермента V_{\max}/K_M , т.е. показатель, характеризующий реальную функциональную активность АХЭ, остается практически неизменной.

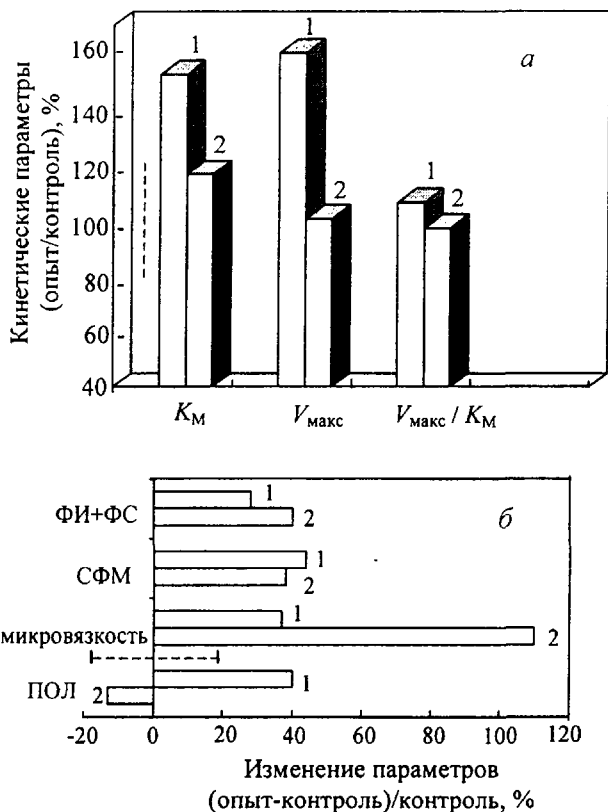


Рис. 2. Эффекты длительного воздействия фенозана К *in vivo*. Введение препарата внутривенно мышам в сверхмалой ($3 \cdot 10^{-14}$ моль/кг) (1) и обычной ($6 \cdot 10^{-6}$ моль/кг) (2) дозах.

а — кинетические параметры АХЭ; б — изменения в липидной компоненте синапсом: уровень пероксидного окисления липидов (ПОЛ) (содержание малонового диальдегида); содержание в сумме фосфолипидов: сфингомиелина (СФМ), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилинозита (ФИ).

Пунктиром обозначен индивидуальный биологический разброс параметров у интактных мышей

Таким образом, через 2 суток после введения препарата эффективность АХЭ синапсом головного мозга полностью восстанавливается при измененных его параметрах K_M и V_{\max} . Эти изменения могут быть обусловлены влиянием фенозана на все пути биосинтеза и регуляции активности фермента, в том числе на структуру и состав мембраны, в которой локализован фермент.

С этой точки зрения представляют интерес данные по изменениям в липидной компоненте синапсом через 2 суток после введения фенозана. Оказалось, что в отличие от обычной сверхмалая доза фенозана не приводит к изменению содержания общих липидов и холестерина, но вызывает существенное увеличение уровня вторичных продуктов пероксидного окисления липидов (рис. 2б). Изменение содержания фосфолипидов, играющих наиболее важную роль в процессах передачи клеточных сигналов, — сфингомиелина, фосфатидилинозита и фосфатидилсерина, а также микровязкости липидного бислоя (метод ЭПР с использованием спинного зонда) сопоставимы для обычной дозы и СМД антиоксиданта. Причем по величине и знаку эти изменения сходны с теми, которые вызывает обычная доза классического антиоксиданта ионола и которые обеспечивают существенное

(более чем в 1,5 раза) повышение чувствительности центральной нервной системы к действию фармакологического агента *n*-хлорамфетамин, усиливающего процессы возбуждения путем активации серотонинергической системы [18, 19]. Таким образом, можно предположить, что и сверхмалые дозы антиоксиданта изменяют чувствительность центральной нервной системы к действию нейро- и психотропных факторов, в том числе лекарственных веществ.

Сравнение действия СМД и обычных доз фенозана дает возможность предположить, что сдвиги в липидной фазе мембран под действием СМД не вносят существенного вклада в изменения кинетических параметров АХЭ, которые фиксируются через 2 суток после введения фенозана К, по-видимому, реализуются другие из возможных путей регуляции активности ацетилхолинэстеразы (рис. 3).



Рис. 3. Возможные пути регуляции активности мембрано-связанной ацетилхолинэстеразы

Изучение влияния фенозана на систему пероксидного окисления липидов мембран головного мозга

Известно, что в реализации влияния фенозана как антиоксиданта на мембраны и клетки задействован комплекс факторов и при концентрациях выше 10^{-6} M влияние обусловлено как неспецифическим включением фенозана в липидную фазу мембраны и его антирадикальной активностью, так и проявляющимся при наномолярных концентрациях специфическим обратимым связыванием фенозана с плазматическими мембранами [20]. Как тот, так и другой путь взаимодействия с мембраной влияет на функциональную активность мембранных белков и системы вторичных мессенджеров, что в свою очередь может приводить к изменениям в обмене липидов и в состоянии липидного бислоя мембран.

В соответствии с этим мы не ожидали получить простую картину влияния этого антиоксиданта на параметры системы пероксидного окисления липидов (ПОЛ). И действительно, как показали результаты исследования, действие фенозана на систему ПОЛ при

введении *in vivo* в организм и при добавлении к суспензии мембран сложным образом зависит от дозы (концентрации) препарата.

Эксперименты *in vitro*. Зависимость, представленная на рис. 4а, иллюстрирует влияние фенозана на скорость окисления липидов в суспензии мембран клеток головного мозга мышей. В соответствующих экспериментах в суспензию вносили непосредственно перед началом проведения реакции окисления растворенный в физиологическом растворе фенозан К и спиртовой раствор фенозана-кислоты. Предполагается, что в случае введения кислоты растворенная в этаноле гидрофобная часть молекулы фенозана включается в липидный бислой мембраны.

Из рис. 4а видно, что при включении в мембрану фенозана его антиоксидантное действие проявляется при концентрациях 10^{-11} и 10^{-5} М, в присутствии водорастворимой формы препарата выраженное антиоксидантное действие наблюдается только при концентрации 10^{-11} М.

Обращает на себя внимание сложный характер зависимости эффекта от концентрации фенозана с проявлением некоторой активации ПОЛ при концен-

трациях антиоксиданта 10^{-13} и 10^{-7} М. Степени активации при этих различающихся на шесть порядков концентрациях близки. Вид зависимости является характерным для действия веществ в сверхмалых дозах [2, 3, 10].

Нами проведена оценка последствия включения фенозана в липидную фазу мембран для системы ПОЛ. Для этого суспензию мембран инкубировали в течение 20 ч при температуре 4 °С в присутствии фенозана (кислоты).

Выявлено увеличение (по сравнению с контролем) количества первичных продуктов ПОЛ — сопряженных гидропероксидов, что свидетельствует о стимуляции ПОЛ в данных условиях эксперимента под действием антиоксиданта во всем исследуемом интервале его концентраций. На первый взгляд, здесь имеется противоречие: увеличению количества первичных продуктов ПОЛ соответствует увеличение содержания двойных связей (см. рис. 4б). По-видимому, это связано с «ужесточением» определенных областей липидного бислоя, которое может препятствовать выходу окисленных продуктов из мембраны. К увеличению жесткости соответствующих участков мембраны может привести связывание антиоксиданта с расположенными на мембране рецепторами, как это известно для ряда лигандов [21]. При затрудненном выходе окисленных продуктов определенный нами индекс ненасыщенности будет включать двойные связи, содержащиеся в первичных продуктах ПОЛ.

Таким образом, фенозан при включении в липидный бислой *in vitro* вызывает стимуляцию ПОЛ. Способность оказывать двойственное действие на ПОЛ — активизировать или замедлять процесс окисления — является одним из свойств биологических антиоксидантов в области обычных концентраций и имеет соответствующие объяснения [22]. Как оказалось, и сверхмалые дозы антиоксиданта могут оказывать стимулирующий эффект.

Введение препарата *in vivo*. На рис. 5 представлены изменения ряда показателей системы ПОЛ в мембранах клеток мозга мышей через 1 ч после внутрибрюшинного введения фенозана К. Судя по снижению скорости накопления продуктов ПОЛ, фенозан, введенный *in vivo*, приводит к торможению ПОЛ. Антиоксидантное действие обнаружено для всех исследованных доз фенозана.

О торможении окисления мембранных липидов свидетельствует и уменьшение под влиянием антиоксиданта количества первичных продуктов ПОЛ. Причем снижение скорости окисления не связано с изменением количества субстрата окисления — липидов и фосфолипидов в мембранах: из рис. 5 видно, что под влиянием введенного фенозана оно не меняется. Увеличение индекса ненасыщенности в липидах также подтверждает проявление антиоксидантного действия фенозана, в частности, отчетливо регистрируется увеличение содержания двойных связей при самой малой из исследованных доз — 10^{-15} моль/кг.

Интересно, что в области обычных терапевтических количеств малая и большая дозы антиоксиданта (10^{-5} и 10^{-4} моль/кг), для которых, как известно, характерно противоположное действие на антиокислительную активность липидов [23] и разнонаправленные биологические эффекты, в нашем случае оказывают противоположное действие на содержание двойных связей. Следует отметить, что снижение скорости

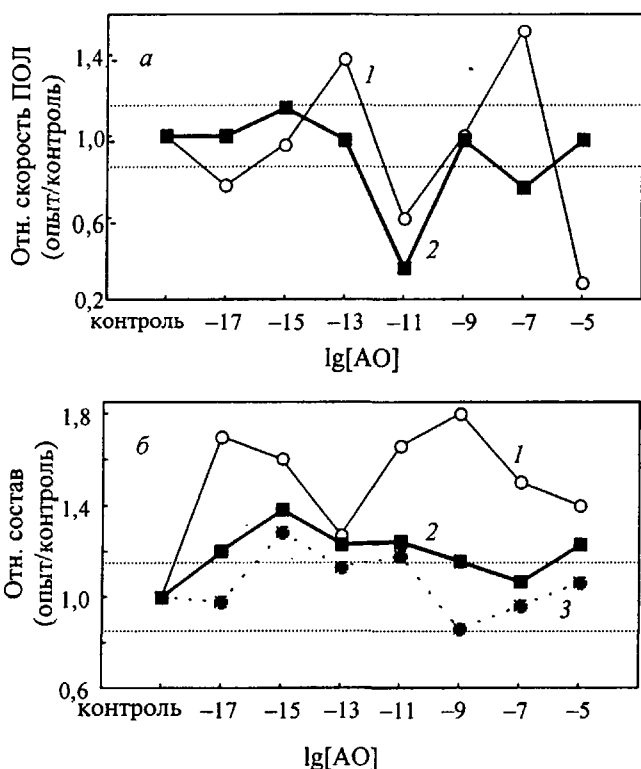


Рис. 4. Влияние фенозана *in vitro* на скорость пероксидного окисления липидов (а) и состав липидной фазы (б) в мембранах клеток головного мозга мышей

а — окисление суспензии мембран (2 мг белка в 1 мл) кислородом воздуха (37 °С) при добавлении в среду реакции спиртового раствора фенозана-кислоты (1) и водорастворимого фенозана К (2). Концентрация этанола в суспензии не более 0,5%; б — преинкубация суспензии мембран со спиртовым раствором фенозана (20 ч при 4 °С).

1 — первичные продукты ПОЛ (двухдневные конъюгаты)/общие липиды; 2 — индекс двойных связей/общие липиды; 3 — фосфолипиды/холестерин.

Горизонтальные линии — границы разброса исследуемых параметров в контроле

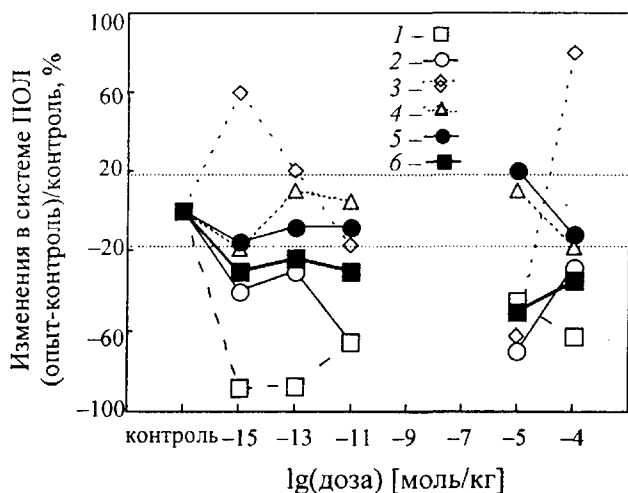


Рис. 5. Изменение скорости ПОЛ и состава липидной фазы в мембранах, выделенных из клеток головного мозга мышей через 1 ч после внутрибрюшинного введения фенозана К.

1 — скорость накопления малонового диальдегида при окислении суспензии мембран кислородом воздуха (37 °С); 2 — содержание первичных продуктов ПОЛ (диеновые конъюгаты); 3 — содержание двойных связей; 4 — содержание общих липидов; 5 — содержание фосфолипидов; 6 — холестерин/фосфолипиды

пероксидного окисления липидов сопровождается адекватным (соответствующим нормальному функционированию системы регуляции ПОЛ [24]) изменением параметров этой системы, что было показано на примере соотношения холестерин/фосфолипиды.

Таким образом, система пероксидного окисления липидов несомненно затрагивается при действии *in vivo* (через 1 ч) и сверхмалых доз фенозана. Можно сделать вывод об антиоксидантном действии СМД фенозана, хотя трудно себе представить, что при этом он проявляет характерные для фенольных антиоксидантов в области больших доз антирадикальные свойства. Механизм антиоксидантного действия СМД требует изучения.

Наблюдавшееся нами различие во влиянии фенозана на систему ПОЛ в мембранах клеток мозга при введении препарата *in vivo* и включении в мембрану *in vitro* скорее всего связано с тем, что эффект СМД, по-видимому, так же, как и в случае введения обычных доз антиоксидантов *in vivo*, по мере своего развития вызывает разные стадии изменения системы ПОЛ (подавления и активации) [23], однако условия, использованные в нашем опыте *in vitro*, не смоделировали ситуацию, реализующуюся в мембранах клеток головного мозга мышей через 1 ч после внутрибрюшинного введения препарата.

На основании изложенного выше материала можно сделать заключение, что сверхмалые дозы синтетического антиоксиданта — ингибитора радикальных процессов могут оказывать на систему ПОЛ в мембранах *in vitro* и *in vivo* эффекты, по направленности и амплитуде сходные с действием этого класса соединений в обычных дозах.

Изучение влияния экзогенного ацетилхолина на активность ацетилхолинэстеразы

Эксперименты *in vitro* с использованием растворимого фермента. Применение в качестве субстрата ацетилтиохолина [25] дало возможность исследовать дей-

ствие ацетилхолина как эффектора (не как субстрата) на изучаемую ферментативную реакцию *in vitro*.

На рис. 6а представлены результаты исследования, полученные при добавлении ацетилхолина в среду реакции гидролиза ацетилтиохолина, катализируемого очищенной растворимой АХЭ. Видно, что при концентрации 10^{-4} М ацетилхолин проявляет себя как конкурентный ингибитор. По мере снижения его концентрации картина несколько меняется. При концентрациях ацетилхолина 10^{-10} – 10^{-12} М регистрируется уменьшение как константы Михаэлиса K_M , так и максимальной скорости реакции. При дальнейшем снижении концентрации эффектора фермента оба параметра — K_M и V_{\max} увеличиваются. Влияние ацетилхолина на кинетические параметры растворимой АХЭ в наибольшей степени сказывается в областях сверхмалых концентраций препарата.

Следует отметить, что константа K_M , т.е. сродство фермента к субстрату, и максимальная скорость реакции (мера каталитической активности фермента) изменяются практически симбатно во всей исследованной области концентраций ацетилхолина. Эффективность фермента (а соответственно и скорость реакции, катализируемой АХЭ при низких, в том числе соответствующих физиологическим, концентрациях субстрата, пропорциональная V_{\max}/K_M) достоверно не изменяется. В кинетическом плане это формально может соответствовать случаю так называемого бесконкурентного ингибирования [26], когда эффектор фермента связывается только с фермент-субстратным комплексом.

Неодинаковая для концентрационных областей направленность эффекта ацетилхолина на кинетические параметры растворимой ацетилхолинэстеразы может быть обусловлена преимущественным связыванием его с разными сайтами фермент-субстратного комплекса при разных концентрациях эффектора в среде реакции. Как известно, ацетилхолинэстераза — фермент, подвергающийся ингибированию «избыточными» концентрациями субстрата путем связывания «дополнительных» молекул субстрата с фермент-субстратным комплексом [27]. Из приведенных выше данных видно, что и в сверхмалых концентрациях ацетилхолин также может выступать как эффектор, модулирующий активность ацетилхолинэстеразы.

Эксперименты *in vitro* с использованием мембрано-связанной АХЭ. Из трех исследованных сверхмалых концентраций ацетилхолина достоверно выражено действие его на мембранный фермент оказывает концентрация 10^{-13} М (рис. 6б). При этом наблюдаются достоверное увеличение как максимальной скорости гидролиза V_{\max} , так и константы K_M и тенденция к снижению эффективности фермента. Таким образом, и в данном случае имеет место однонаправленность изменения кинетических параметров (V_{\max} и K_M) ацетилхолинэстеразы, как и в экспериментах с растворимым ферментом (а также, как и при действии антиоксиданта фенозана), хотя характер самих по себе изменений может быть разной. Фермент реагирует на введение ацетилхолина (об этом говорят изменения его основных кинетических параметров), однако конформация молекулы АХЭ меняется, по-видимому, так, что сохраняется неизменной ее эффективность. Имеет место своего рода адаптация на уровне фермента.

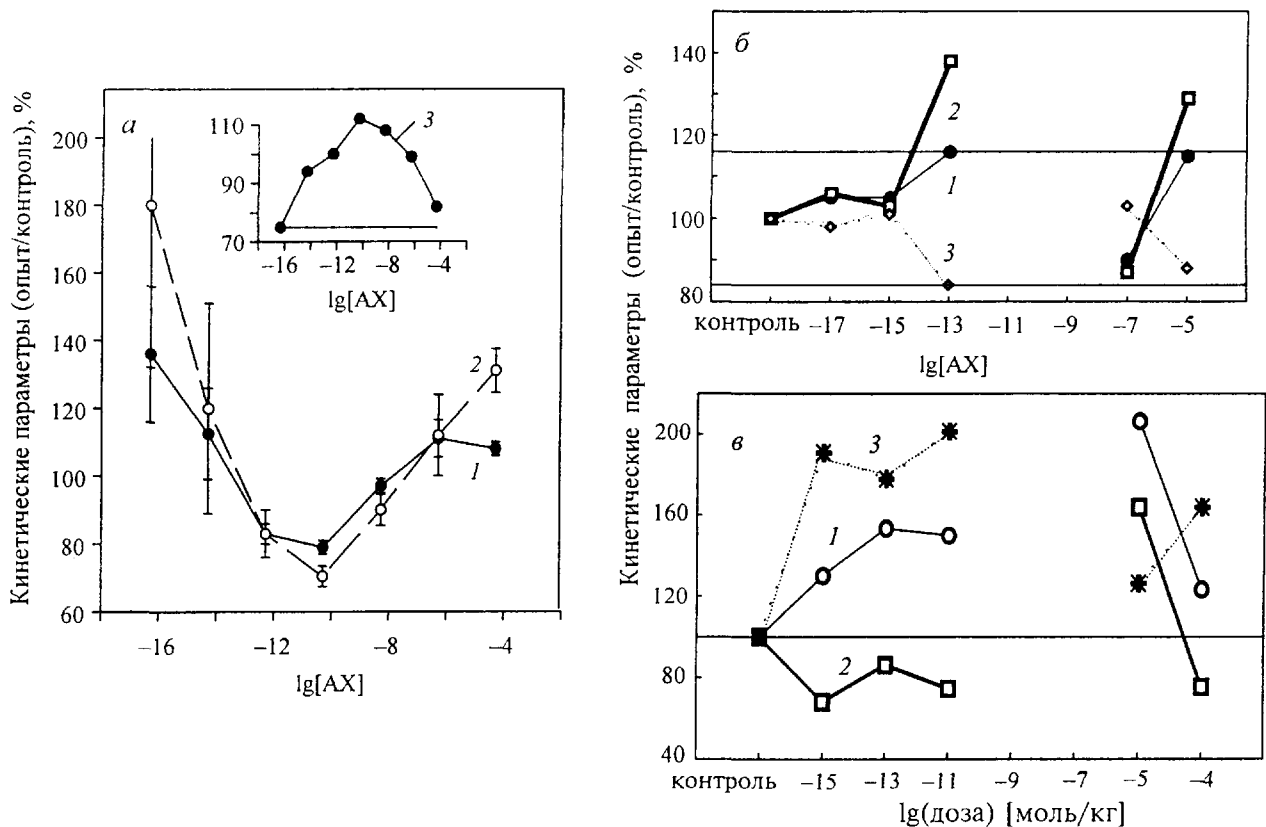


Рис.6. Влияние ацетилхолина на кинетические параметры ацетилхолинэстеразы:

1 — максимальная скорость гидролиза ацетилтиохина V_{\max} ; 2 — константа Михаэлиса K_M ; 3 — V_{\max}/K_M .

а — введение *in vitro* иодида ацетилхолина в среду реакции с растворимой АХЭ; б — введение *in vitro* иодида ацетилхолина в среду реакции с АХЭ, связанной с мембранами клеток головного мозга мышей; в — введение внутривбрюшинно препарата мышам с выделением мембранной фракции через 1 ч

Таким образом, в сверхмалых концентрациях ацетилхолин проявляет свойства эффектора, модулирующего активность свободной и мембраносвязанной ацетилхолинэстеразы.

Введение препарата *in vivo*. Рис. 6в иллюстрирует изменения кинетических параметров АХЭ мембран клеток головного мозга мышей, выделенных через 1 ч после внутривбрюшинного введения животным ацетилхолина в дозах от 10^{-4} до 10^{-16} моль/кг. Отметим, что доза 10^{-4} моль/кг близка к терапевтической [28]. Видно, что под действием экзогенного ацетилхолина максимальная скорость реакции V_{\max} увеличивается при всех исследованных его дозах, а константа K_M уменьшается при всех дозах, кроме 10^{-5} моль/кг. Эффективность фермента V_{\max}/K_M существенно возрастает. Можно говорить, таким образом, об активации фермента при введении ацетилхолина *in vivo*, и активация выражена сильнее при значительно более низких дозах, чем те, которые считаются терапевтическими.

Сравнение эффектов ацетилхолина в малых и сверхмалых дозах *in vivo* и *in vitro* приводит к заключению, что его действие на АХЭ головного мозга *in vivo* имеет другие механизмы, чем при воздействии на растворимый и мембраносвязанный фермент. Не исключено, что это обусловлено практически полной, как считают, непроницаемостью ацетилхолина через гематоэнцефалический барьер [29] и что наблюдаемый биоэффект есть проявление генерализованного действия на организм.

Изучение влияния экзогенного ацетилхолина *in vivo* на липидную компоненту мембран клеток головного мозга мышей

На рис. 7 представлены изменения ряда показателей состояния липидной фазы мембран клеток головного мозга через 1 ч после внутривбрюшинного введения иодида ацетилхолина в широком интервале доз, включая сверхмалые. Видно, что содержание общих липидов в мембранах при введении ацетилхолина *in vivo* мало изменяется — в присутствии самой большой дозы препарата оно снижается, при дозе 10^{-15} моль/кг — несколько увеличивается. Промежуточные дозы ацетилхолина приводят к незначительным изменениям содержания общих липидов. Однако соотношение липидов под влиянием экзогенного ацетилхолина изменяется существенно. При дозах 10^{-14} – 10^{-4} моль/кг наблюдается увеличение содержания общих фосфолипидов. Кроме того, обнаруживается уменьшение содержания холестерина.

Следует отметить также уменьшение соотношения холестерин/фосфолипиды, которое, как известно, является одним из показателей, определяющих жесткость липидной фазы мембран. Эффективность в отношении влияния на этот показатель обнаруживают все исследованные нами дозы препарата, причем сверхмалые дозы оказывают такое же действие, как и большие. Известно, что при старении организма происходит увеличение жесткости (уменьшение текуче

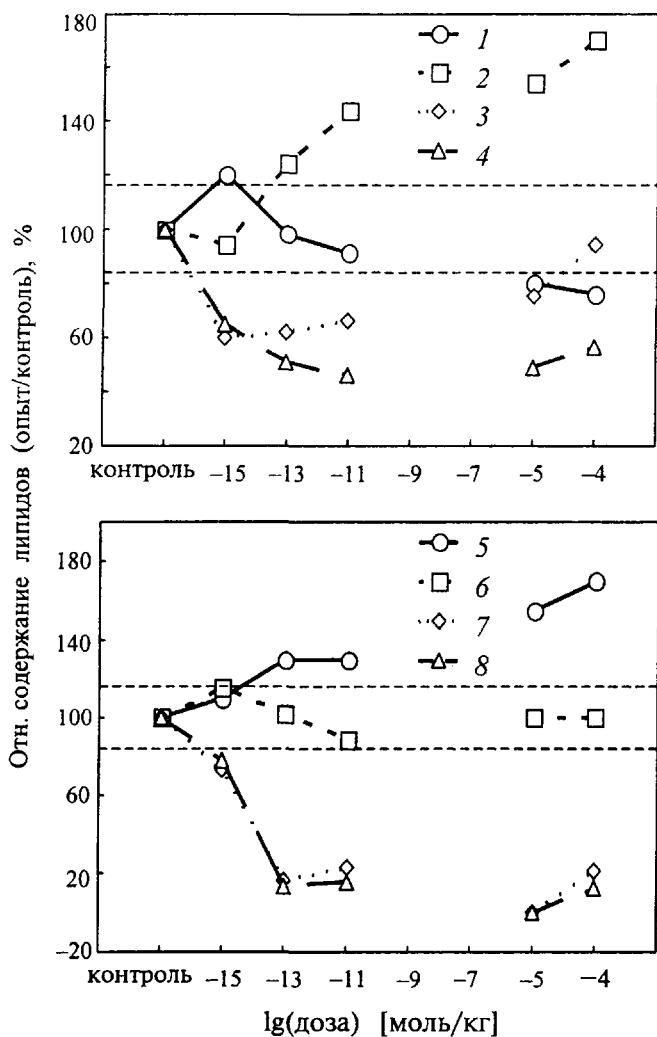


Рис. 7. Влияние ацетилхолина *in vivo* на состав липидной фазы в мембранах, выделенных из клеток головного мозга мышей через 1 ч после внутривенного введения препарата

1 — общие липиды/белок; 2 — фосфолипиды/общие липиды; 3 — холестерин/общие липиды; 4 — холестерин/фосфолипиды; 5 — двойные связи/общие липиды; 6 — двойные связи/фосфолипиды; 7 — первичные продукты ПОЛ (диеновые конъюгаты)/общие липиды; 8 — диеновые конъюгаты/фосфолипиды

сти) липидной фазы мембран нервных окончаний клеток головного мозга за счет увеличения содержания холестерина, соотношения холестерин/фосфолипиды, с чем связывается характерное для старения ослабление памяти и обучаемости [30]. С этой точки зрения обнаруженный эффект снижения содержания холестерина и соотношения холестерин/фосфолипиды в мембранах клеток головного мозга представляется весьма важным. В связи с этим не исключена возможность применения иодида ацетилхолина в сверхмалых дозах в качестве ноотропного средства.

Изменения, отражающие влияние введенного *in vivo* ацетилхолина на пероксидное окисление липидов в мембранах клеток головного мозга, имитируют антиоксидантное действие препарата (рис. 7б). Ход кривых относительного содержания двойных связей в липидах и содержания фосфолипидов свидетельствует о том, что сдвиги в содержании двойных связей обусловлены изменением количества фосфолипидов. В

расчете же на фосфолипиды количество двойных связей не меняется, что может наводить на мысль о как бы антиоксидантном действии ацетилхолина, причем во всем исследованном интервале доз. Об антиоксидантном эффекте говорит и снижение содержания диеновых конъюгатов в липидах головного мозга животных после введения препарата. Очевидно, что под его действием ПОЛ в мембранах клеток мозга может практически полностью ингибироваться.

Таким образом, при введении ацетилхолина *in vivo* за 1 ч до декапитации животных, в том числе и в СМД, несомненно затрагивается система ПОЛ в мембранах клеток головного мозга. По-видимому, нарушений (разобнений) в системе регуляции ПОЛ не происходит. Об этом говорит то, что снижение скорости пероксидного окисления липидов сопровождается адекватным нормальным функционированию системы изменением ее параметров [24], например, уменьшением содержания холестерина и соотношения холестерин/фосфолипиды. В целом можно сделать вывод об антиоксидантном действии экзогенного ацетилхолина. По-видимому, это действие в дозах от 10^{-4} до 10^{-12} моль/кг может быть обусловлено и влиянием ацетилхолина на обмен фосфолипидов в организме — содержание фосфолипидов под влиянием почти всех исследованных доз препарата увеличивается.

Наблюдаемый антиоксидантный эффект может быть связан с синергизмом в действии эндогенных природных антиоксидантов и фосфолипидов, вероятнее всего, фосфатидилхолина [31]. Антиоксидантное действие может отчасти симулироваться изменением жирнокислотного состава фосфолипидов в сторону увеличения содержания более насыщенных компонентов. О такого рода влиянии ацетилхолина может свидетельствовать факт низкого содержания в липидах животных опытных групп сопряженных гидропероксидов.

Заключение

На основании закономерностей, обнаруженных нами при изучении влияния СМД фенозана и экзогенного ацетилхолина на ацетилхолинэстеразу, представления о сигнальных путях действия СМД биологически активных веществ, данные ранее в работе [4] и относящиеся к такой сложной системе, как клетка с участками на ее поверхности, обладающими разным средством и специфичностью связывания, можно распространить на уровень мембраносвязанного и даже индивидуального фермента. Отметим, что для фермента в свободном состоянии характерно наличие как в пределах, так и вне активного центра, множественных аллостерических сайтов, обуславливающих активацию или ингибирование при действии соответствующих лигандов [32—35].

Сопоставление эффектов, обнаруженных в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, дает основание заключить, что и в модельных системах, и *in vivo* проявляются аналогичные закономерности, характерные для действия СМД. Отметим, что при введении исследуемых биологически активных веществ *in vivo* амплитуда изменений активности фермента оказывалась больше, чем в модельных системах. По-видимому, изменения в свойствах фермента в результате системного действия антиоксиданта на уровне организма могут быть как следствием взаимодействия с ферментом, прямого

или опосредованного мембраной, так и комплексным проявлением суммы других изменений метаболизма в организме вследствие действия биологически активных веществ на другие мишени. Последний тезис подтверждается и на примере ацетилхолина, который, как считается, не поступает в головной мозг при внутривенном введении.

Таким образом, исследованные соединения — синтетический антиоксидант фенозан и эндогенный медиатор ацетилхолин действуют в сверхмалых дозах, проявляя характерные для эффектов СМД закономерности как на уровне индивидуального кристаллического фермента ацетилхолинэстеразы, так и на уровне сложной надмолекулярной структуры — мембран клеток головного мозга мышей *in vitro* и *in vivo*. При этом затрагивается одна из важных регуляторных систем клетки — система пероксидного окисления липидов в биологических мембранах.

ЛИТЕРАТУРА

- Blumenfeld L.A., Grossberg A.Ju., Tikhonov A.N. J. Chem. Phys., 1991, v. 95, p. 7541—7544.
- Zaitsev S.V., Sazanov L.A. J. Chem. and Biochem. Kinetics, 1991, v. 1, № 3, p. 21—26.
- Зайцев С.В., Сазанов Л.А. Биохимия, 1992, т. 57, с. 1443.
- Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Худяков И.В. Изв. РАН, Сер. биол., 1990, № 2, с. 184—193.
- Блюменфельд Л.А. Биофизика, 1993, т. 38, № 1, с. 129.
- Молочкина Е.М., Озерова И.Б., Бурлакова Е.Б. Тез. 2 Межд. симп. "Механизмы действия сверхмалых доз". Москва, 1995, с. 101.
- Озерова И.Б., Молочкина Е.М. Там же, Москва, 1995, с. 102.
- Molochkina E.M., Ozerova I.B., Burlakova E.B. IV Int. Conf. (OHOLO) "Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases". Abstrs, 1997, p. 40.
- Molochkina E.M., Ozerova I.B., Burlakova E.B. In: Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. Eds.: A. Fisher, I. Hanin, M. Yoshida, N.-Y.: Plenum Press, 1998, p. 183.
- Бурлакова Е.Б. Вестник РАН, 1994, т. 64, № 5, с. 425.
- Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Курнакова Н.В., Бурлакова Е.Б. Биохимия, 1994, т. 59, № 2, с. 193—200.
- Мальцева Е.Л., Курнакова Н.В., Пальмина Н.П., Бурлакова Е.Б. Биол. мембраны, 1992, т. 9, № 10—11, с. 1028.
- Maltseva Ye.L., Palmyna N.P., Kurmakova N.V., Boskoboynik D., Burlakova Ye.B. Abstrs of 2nd Int. Congress on Ultra Low Doses, Bourdeaux, France, 1993, p.2600.
- Пальмина Н.П., Богданова Н.Г., Мальцева Е.Л., Пынзарь Е.И. Биол. мембраны, 1992, т. 9, № 8, с. 810—820.
- Пынзарь Е.И., Богданова Н.Г., Пальмина Н.П. Там же, 1995, т. 12, № 3, с. 279—287.
- Трещенкова Ю.А., Голошапов А.Н., Бурлакова Е.Б. Тез. V Межд. конф. "Биоантиоксидант". Москва, 1998, с. 182—183.
- Чернявская Л.И. Роль липидов и их физико-химических характеристик в регуляции активности холинергической системы. Автореф. дисс. канд. биол. наук, Москва, 1990.
- Молочкина Е.М., Боровок Н.В., Каипова Г.Д., Бурлакова Е.Б. В сб.: «Клеточная сигнализация». Под ред. акад. М. А. Островского и П. Г. Костюка. М.: Наука, 1992, с. 103—115.
- Боровок Н.В., Молочкина Е.М., Дубинская Н.И., Бурлакова Е.Б. Нейрохимия, 1988, т. 7, № 2, с. 178—188.
- Хохлов А.П. Тез. III Всес. конф. «Биоантиоксидант». Москва, 1989, т. I, с. 144—145.
- Rosenberg P.H. Arch. Pharmacol., 1979, v. 302, № 1, p. 199—203.
- Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г. Биол. мембраны, 1998, т. 15, № 2, с. 137—167.
- Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М., Пальмина Н. П., Храпова Н. Г. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М.: Наука, 1975, 214 с.
- Burlakova Ye.B., Palmyna N.P., Maltseva Ye.L. In: Membrane Lipid Oxidation. Ed. C. Vigo-Pelfrey. CRC Press, 1991, v. III, p.209—237.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. Biochem. Pharmacol., 1961, v. 7, p. 88—96.
- Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990, 348 с.
- Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: изд. МГУ, 1976, 320 с.
- Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Наука, 1997, т. 1, 543 с.
- Бредбери М. Концепция гематоэнцефалического барьера. М.: Медицина, 1985, 480 с.
- Shinitzky M. Gerontology, 1987, v. 33, p. 149—154.
- Бурлакова Е.Б., Аристархова С.А., Федорова Л.В., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н. Биол. науки, 1991, № 9, с. 21—27.
- Садыков А.С., Розенгарт Е.В., Абдувахабов А.А., Асланов Х.А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Ташкент: ФАН Узб. ССР, 1976, 207 с.
- Cohen S.G., Chishti S.B., Bell D.A. e. a. Biochim. Biophys. Acta, 1991, v. 1076, p. 112—122.
- Ishihara Y., Kato K., Goto G. Chem. Pharm. Bul., 1991, v. 39, p. 3225—3235.
- Ishihara Y., Miyamoto M., Nakayama T., Goto G. Ibid., 1993, v. 41, p. 529—538.