

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

Одним из главных социально значимых заболеваний в настоящее время является болезнь Альцгеймера (БА). Основные дающие результат средства терапии БА – это ингибиторы холинэстераз, позволяющие поддерживать в мозге уровень ацетилхолина, дефицит которого приводит к характерным для БА нарушениям. Поскольку решающую роль в патогенезе и развитии БА играет окислительный стресс, в клинике используют витамин Е, главным компонентом которого является природный антиоксидант альфа-токоферол (ТФ). Однако, применение витамина Е часто не дает положительных результатов. Одной из причин этого может быть его побочное действие, в частности, влияние на холинэстеразную активность. Задачей нашей работы было изучить влияние ТФ на активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) мозга при его введении в организм. Поскольку ТФ относится к веществам, оказывающим существенный эффект на разные биологические объекты в сверхмалых концентрациях, представляло интерес сравнить его действие в обычной и сверхмалой дозах (СМД).

В работе использовали мышей линии Balb, самцов, массой 20-24 г. Альфа-токоферол (ТФ) вводили в дозах 10^{-14} или 10^{-4} моль/кг. ТФ растворяли в 0,5 % спирте и вводили внутривентриально за сутки до декапитации используемых для исследования животных. ТФ для введения в сверхмалой дозе готовили методом последовательного разбавления спиртового раствора дистиллированной водой. Контрольным животным вводили 0.5 % этанол или дистиллированную воду. Выделение и очистка синапсом и цитоплазматической фракции головного мозга мышей проводилась методом дифференциального центрифугирования. Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) определяли спектрофотометрически по методу Элмана, используя ацетилтиохолин (АТХ) в качестве субстрата. Скорость АХЭ-азной реакции определяли в области концентраций субстрата 0.2 – 4.0 мМ, включающей в себя участок характерного для АХЭ ингибирования субстратом.

Влияния введенного животным в обеих дозах ТФ на холинэстеразную активность цитоплазматической фракции не обнаружено, в то время как влияние на АХЭ фракции нервных окончаний (синапсом) было существенным. 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 K_m при незначительно (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 K_m . Отношение V_{max}/K_m (эффективность фермента), которое 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.

Выявлено влияние введенного мышам ТФ на субстратное ингибирование АХЭ синапсом. В контроле процент ингибирования АХЭ-азной реакции при концентрации субстрата 4 мМ составляет 53 % по отношению к максимальной скорости, в случае дозы ТФ 10^{-4} моль/кг – 40 %, для дозы 10^{-14} моль/кг- всего 17 %. Это говорит о возможной роли периферического анионного центра фермента в активации АХЭ, вызванной токоферолом, и о его большем вкладе при действии ТФ в СМД.

В опыте *in vitro* при действии ТФ в диапазоне концентраций 10^{-16} – 10^{-4} М на активность растворимой АХЭ эритроцитов обнаружено некоторое, хотя и слабое, стимулирующее действие ТФ, наибольшее (порядка 15 %) - при концентрации ТФ 10^{-10} М. Можно предположить, что непосредственное действие ТФ на АХЭ не вносит существенного вклада в наблюдаемую в результате его введения в организм активацию мембранного фермента синапсом.

Таким образом, обычная и сверхмалая дозы альфа-токоферола оказывают выраженный активирующий эффект на мембранную АХЭ нервных окончаний головного мозга мышей. Разное влияние на кинетические параметры говорит о преобладании различных механизмов действия при обычной и сверхмалой дозах препарата, что, вероятно, можно объяснить с точки зрения современных представлений о разных механизмах действия обычных доз и СМД токоферола на структуру мембран.

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