

Б. А. Ройтуб, О. А. Лапоногов, Н. Н. Олешко, В. А. Черкес,
Ю. П. Лиманский, В. Н. Оксамитный, В. И. Цымбалюк, Н. Г. Матюк

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ КРОВИ ПРИ ПАРКИНСОНИЗМЕ

В настоящее время достигнуты значительные успехи в изучении патогенетических механизмов паркинсонизма, его хирургическом лечении и фармакотерапии. Однако вопросы оптимальной тактики при терапии этого заболевания во многом еще не ясны. Причина кроется, вероятно, в том, что не все метаболические нарушения у больных паркинсонизмом в достаточной степени выяснены, а также в невозможности до сих пор адекватно компенсировать нейротропными средствами даже те биохимические дисфункции, которые очевидны.

Известно, что моноаминергические системы мозга тесно взаимодействуют с холинергической системой. Исследования в эксперименте на животных, проведенные нами ранее [8], показали, что одностороннее выключение нигростриатной дофаминергической системы сопровождается на стороне разрушения снижением активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) неостриатума, на интактной стороне — повышением ее. Аналогичная закономерность изменений при таких же условиях эксперимента выявлена для дофамина [14—16, 19, 20].

Проведенные нами модельные опыты показали, что изменения активности АХЭ могут быть воспроизведены при ее взаимодействии с препаратами ДОФА и дофамина [9]. Активация АХЭ при взаимодействии с ДОФА была обнаружена не только в модельных опытах и при исследовании ткани неостриатума животных, но и в крови больных паркинсонизмом [9, 11]. Дисфункция при паркинсонизме дофаминергической нигростриатной системы находит свое отражение в существенном снижении по сравнению с нормой экскреции с мочой катехоламинов — ДОФА, дофамина, норадреналина, адреналина [4].

Согласно данным литературы [1, 3, 4 и др.], нейрохирургическое лечение ригидной, ригидно-дрожательной и дрожательной форм паркинсонизма посредством селективной деструкции вентрооральных ядер таламуса в 65—85 % случаев приводит к стойким положительным результатам. Механизм благоприятных изменений, наступающих при этом оперативном вмешательстве, неясен. Имеются указания [5], что после операции экскреция катехоламинов возрастает примерно на 40 %, причем более значительно у больных с хорошим клиническим результатом после операции, чем у больных с незначительным эффектом. В связи с этим представляет интерес выяснить характер взаимодействия АХЭ крови больных с препаратом ДОФА под воздействием как хирургического лечения, так и влияния приема l-ДОФА, широко используемого при лечении паркинсонизма.

Методика. Активность АХЭ крови исследовали у 30 человек, среди которых 11 — здоровые мужчины (контрольная группа), средний возраст 26 (20—34) лет, и 19 — больные паркинсонизмом (с выраженными явлениями дрожания и скованности — ригидность и брадикинезия), средний возраст 52 (27—63) года.

Активность АХЭ крови у больных определяли в исходном состоянии, спустя 1,5—2,0 ч после приема внутрь (нагрузки) препарата l-ДОФА (50 мг) и после оперативного вмешательства — строго дозированной криодеструкции оральных вентральных ядер таламуса (по классификации [17]) объемом 10—11 мм в диаметре. В 89,5 % случаев был достигнут положительный послеоперационный результат, в остальных — дрожание и скованность частично остались.

Активирующее действие ДОФА на АХЭ определяли сравнением активности АХЭ до и после прибавления препарата l-ДОФА ($1,86 \cdot 10^{-3}$ моль) к исследуемой крови.

Кинетику активности АХЭ определяли модифицированным нами [10] электрометрическим методом с автоматической чернильной регистрацией [13, 18]. Активность АХЭ выражали количеством мкмоль уксусной кислоты, высвобождаемой при расщеплении ацетилхолина 100 мл цельной крови за 1 мин. Для изучения взаимодействия ДОФА и АХЭ использовали препарат β -(3,4-дигидроксифенил) DL- α -аланин (Reanal). Активность АХЭ определяли в реакционной смеси, состоящей из буферной системы (трис-соляная

кислота $2,5 \times 10^{-3}$ — $1,1 \times 10^{-2}$ моль; pH 8,0 в присутствии 0,3 моль NaCl и 0,06 моль KCl) и ацетилхолина (АХ), к которым прибавляли 0,1 мл исследуемой крови. Для определения константы Михаэлиса (Км) активность АХЭ исследовали при различных количествах АХ ($2 \times$, $4 \times$, $8 \times$, $12 \times$, $20 \times$, $28 \times$, 40×10^{-6} моль), добавленных в реакционную смесь.

Полученные результаты обработаны статистически (двухвыборочный ранговый критерий Вилкоксона — Манна — Уитни [7]).

Результаты и обсуждение. По мере повышения концентрации АХ в реакционной смеси активность АХЭ, согласно принципу Михаэлиса — Ментен, возрастает. При всех исследованных концентрациях АХ от $2,0$ до $40,0 \times 10^{-6}$ моль активность АХЭ крови была ниже у больных по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$, табл. 1). Наблюдаются также существенные отличия между изменением активности АХЭ под влиянием прибавленного к крови препарата 1-ДОФА в норме (табл. 2) и при паркинсонизме (табл. 3). В пределах концентраций АХ $2,0$ — $28,0 \times 10^{-6}$ моль разницы в активности АХЭ до и после прибавления препарата 1-ДОФА к крови здоровых людей не обнаружено. Тем не менее, в пределах концентрации АХ $28,0$ — $40,0 \times 10^{-6}$ моль отмечена выраженная тенденция к торможению активности АХЭ. Так, при концентрации АХ $28,0 \times 10^{-6}$ моль активность АХЭ в исходном состоянии составляла $98,6 \pm 1,2$, тогда как после прибавления препарата 1-ДОФА наступило снижение активности АХЭ до $89,9 \pm 3,4$ ($p > 0,05$); при концентрации же АХ $40,0 \times 10^{-6}$ моль под влиянием добавления 1-ДОФА снижение активности АХЭ наблюдалось до $101,7 \pm 1,5$ по сравнению с $104,4 \pm 1,3$ ($p > 0,05$) в исходном состоянии.

Противоположный характер изменений обнаружен в крови больных паркинсонизмом: в пределах концентраций АХ $8,0$ — $28,0 \times 10^{-6}$ моль добавление к крови препарата 1-ДОФА сопровождалось достоверным повышением активности АХЭ.

После предварительной нагрузки организма больного препаратом 1-ДОФА, последующее прибавление его к крови, взятой у больного, не сопровождалось повышением активности АХЭ при концентрациях АХ $4,0 \times$, $12,0 \times$ и $20,0 \times 10^{-6}$ моль (табл. 4). При этом достоверное повышение активности АХЭ отмечено при концентрации АХ $40,0 \times 10^{-6}$ моль (активность АХЭ повышалась после прибавления к крови 1-ДОФА до $92,5 \pm 1,2$ по сравнению с $89,9 \pm 2,3$, которая наблюдалась только после приема препарата 1-ДОФА).

Аналогичный результат (отсутствие достоверных изменений активности АХЭ) наблюдался после оперативного вмешательства и без предварительной нагрузки организма больного препаратом 1-ДОФА (табл. 5). Добавление препарата 1-ДОФА к крови таких больных в пределах концентраций АХ $8,0 \times$, $12,0 \times$, $20,0 \times$ и $40,0 \times 10^{-6}$ моль не сопровождалось повышением активности АХЭ. Достоверное повышение активности АХЭ отмечено только при концентрации АХ $4,0 \times 10^{-6}$ моль.

Таким образом, прибавление к крови больных паркинсонизмом 1-ДОФА сопровождается активацией АХЭ крови, в то время как этот эффект отсутствует в норме, при нагрузке больных препаратом 1-ДОФА, а также после оперативного вмешательства. Следует подчеркнуть, что активирующее влияние 1-ДОФА по отношению к АХЭ крови больных паркинсонизмом наблюдается на фоне ее сниженного уровня по сравнению с контролем, и величины активности АХЭ крови больных при добавлении препарата 1-ДОФА не достигают нормальных значений (сравнить активность АХЭ крови здоровых и больных людей (табл. 1) и активность АХЭ крови больных в присутствии препарата 1-ДОФА (табл. 3)).

Для более глубокого понимания механизма взаимодействия 1-ДОФА с АХЭ мы исследовали изменение константы Михаэлиса (Км) АХЭ крови больных паркинсонизмом и здоровых людей. Оказалось, что Км АХЭ крови при паркинсонизме повышена по сравне-

нию с нормой. Так, у больных $K_m = 4,4 \times 10^{-6}$ моль, тогда как в норме $K_m = 3,8 \times 10^{-6}$ моль [11]. Прибавление к крови больных препарата *l*-ДОФА сопровождается тенденцией к снижению K_m : $4,15 \times 10^{-6}$ моль в присутствии препарата по сравнению с $4,64 \times 10^{-6}$ моль в исходном состоянии. Более эффективное снижение K_m крови

Т а б л и ц а 1. Активность АХЭ крови здоровых людей и больных паркинсонизмом в зависимости от количества ацетилхолина в реакционной смеси

Концентрация АЦХ $\times 10^{-6}$ моль	Активность АХЭ, мкмоль уксусной кислоты, 100 мл, 1 мин		$p <$
	здоровые	больные	
2,0	$44,1 \pm 2,6$ $n=11$	$40,5 \pm 0,7$ $n=5$	0,001
4,0	$53,3 \pm 2,0$ $n=11$	$46,6 \pm 1,1$ $n=19$	0,001
12,0	$76,8 \pm 4,6$ $n=11$	$62,9 \pm 1,0$ $n=19$	0,001
28,0	$98,6 \pm 1,2$ $n=11$	$81,6 \pm 4,2$ $n=5$	0,001
40,0	$104,4 \pm 1,3$	$92,0 \pm 0,6$	0,001

Т а б л и ц а 2. Активность АХЭ крови здоровых людей ($n=11$) в зависимости от количества ацетилхолина в реакционной смеси в исходном состоянии и в присутствии $1,86 \times 10^{-3}$ моль препарата *l*-ДОФА

Концентрация АЦХ $\times 10^{-6}$ моль	Активность АХЭ, мкмоль уксусной кислоты, 100 мл, 1 мин		$p >$
	исходная	в присутствии <i>l</i> -ДОФА	
2,0	$44,1 \pm 2,6$	$46,1 \pm 2,3$	0,2
4,0	$53,3 \pm 2,0$	$52,9 \pm 2,7$	0,5
12,0	$76,8 \pm 4,6$	$76,7 \pm 3,5$	0,5
28,0	$98,6 \pm 1,2$	$89,9 \pm 3,4$	0,05
40,0	$104,4 \pm 1,3$	$101,7 \pm 1,5$	0,05

Т а б л и ц а 3. Активность АХЭ крови больных паркинсонизмом ($n=19$) в зависимости от количества ацетилхолина в реакционной смеси в исходном состоянии и в присутствии $1,86 \times 10^{-3}$ моль препарата *l*-ДОФА

Концентрация АЦХ $\times 10^{-6}$ моль	Активность АХЭ, мкмоль уксусной кислоты, 100 мл, 1 мин		p
	исходная	в присутствии <i>l</i> -ДОФА	
2,0	$40,5 \pm 0,7$	$48,0 \pm 4,5$	$> 0,1$
4,0	$46,6 \pm 1,1$	$46,5 \pm 1,2$	$> 0,5$
8,0	$56,8 \pm 1,7$	$58,8 \pm 1,6$	$< 0,05$
12,0	$62,9 \pm 1,0$	$65,2 \pm 1,0$	$< 0,01$
20,0	$76,7 \pm 1,9$	$81,1 \pm 2,1$	$< 0,02$
28,0	$81,6 \pm 4,2$	$89,7 \pm 1,3$	$< 0,05$
40,0	$92,0 \pm 0,6$	$92,3 \pm 1,0$	$> 0,1$

больных отмечено после оперативного вмешательства. Так, K_m после операции снизилась до $3,84 \times 10^{-6}$ моль по сравнению с $4,64 \times 10^{-6}$ моль в исходном состоянии.

Как известно, константа Михаэлиса (K_m), являясь константой диссоциации энзимосубстратного комплекса [ES], представляет собой меру связывающих сил или «сродства» фермента [E] к субстрату [S]. Чем меньше K_m , тем выше сродство фермента к субстрату, по-

сколько малое значение константы указывает, что равновесие между [E], [S] и [ES] смещается в сторону образования [ES].

Анализ значений K_m АХЭ крови, наблюдаемых при паркинсонизме, а именно повышение ее величины по сравнению с нормой, свидетельствует о нарушении функции АХЭ, что может найти отражение в дисфункции ацетилхолинового обмена. Снижение величины K_m под влиянием l-ДОФА, по-видимому, обусловлено сдвигами, направленными на нормализацию конформации АХЭ. Важным является снижение K_m после оперативного вмешательства.

Таблица 4. Активность АХЭ крови больных паркинсонизмом ($n=19$) после приема препарата l-ДОФА в зависимости от количества ацетилхолина в реакционной смеси в исходном состоянии и в присутствии $1,86 \times 10^{-3}$ моль препарата l-ДОФА

Концентрация АЦХ, $\times 10^{-6}$ моль	Активность АХЭ, мкмоль уксусной кислоты, 100 мл, 1 мин		p
	исходная	в присутствии l-ДОФА	
4,0	$46,8 \pm 1,5$	$48,1 \pm 1,7$	$>0,1$
8,0	$57,2 \pm 1,8$	$57,8 \pm 1,5$	$<0,02$
12,0	$66,6 \pm 2,2$	$64,5 \pm 2,3$	$>0,1$
20,0	$77,3 \pm 1,7$	$79,2 \pm 1,1$	$>0,5$
40,0	$89,9 \pm 2,3$	$92,5 \pm 1,2$	$<0,05$

Таблица 5. Активность АХЭ крови больных паркинсонизмом ($n=19$) после оперативного вмешательства в зависимости от количества ацетилхолина в реакционной смеси в исходном состоянии и в присутствии $1,86 \times 10^{-3}$ моль препарата l-ДОФА

Концентрация АЦХ, $\times 10^{-6}$ моль	Активность АХЭ, мкмоль уксусной кислоты, 100 мл, 1 мин		p
	исходная	в присутствии l-ДОФА	
4,0	$46,9 \pm 1,6$	$49,1 \pm 1,1$	$<0,05$
8,0	$58,5 \pm 0,8$	$58,0 \pm 0,8$	$>0,2$
12,0	$65,0 \pm 1,2$	$64,9 \pm 1,5$	$>0,5$
20,0	$75,0 \pm 2,1$	$76,0 \pm 1,9$	$>0,5$
40,0	$90,8 \pm 1,1$	$91,8 \pm 1,1$	$>0,1$

Таким образом, данные, полученные нами в эксперименте на животных, в модельных опытах и в клинике при исследовании крови больных паркинсонизмом, указывают на существование тонкой зависимости между активностью АХЭ и состоянием дофаминового обмена. За последние годы в литературе накоплено значительное количество работ [2, 6], указывающих на то, что АХЭ относится к группе аллостерических ферментов. В молекуле аллостерических ферментов, как известно, имеется в основном два пространственно разделенных участка — активный (каталитический) и регуляторный (аллостерический). Молекула аллостерического эффектора (которым может служить различное физиологически активное вещество, в том числе и l-ДОФА) связывается с аллостерическим центром фермента и изменяет его конформационную структуру, т. е. геометрические взаимоотношения между остатками аминокислот в активном центре. В результате активность фермента увеличивается (активация) либо уменьшается (ингибирование). Важным количественным показателем, который характеризует степень взаимодействия ферментативных центров, связывающих субстрат, является, как известно, коэффициент Хилла — n . Обычно считают, что с увеличением степени взаимодействия каталитических центров фермента с субстратом коэффициент n возрастает по сравнению с контролем.

Проведенные нами ранее исследования [12] показали, что при взаимодействии ДОФА ($19,0 \times 10^{-3}$ моль) с АХЭ при концентрации АХ [S] $\sim (28,0-144) \times 10^{-5}$ моль коэффициент Хилла равен 2,50 на фоне повышения активности АХЭ по сравнению с контролем/[S] $\sim (2,0-28,0) \times 10^{-5}$ моль, $n=0,40$ и [S] $\sim (28,0-80,0) \times 10^{-5}$ моль, $n=1,30$. Повышение коэффициента Хилла при взаимодействии l-ДОФА с АХЭ может указывать на структурную перестройку АХЭ, вызывающую повышение ее активности. Следует думать, что в нормальных условиях ДОФА является тем метаболитом, который поддерживает оптимальную активность фермента. У здоровых лиц ДОФА, по-видимому, присутствует в АХЭ, находясь в связанном с аллостерическим центром АХЭ состоянии. И поэтому прибавление l-ДОФА к крови в норме не сопровождается активацией АХЭ. Активирующий

эффект 1-ДОФА, очевидно, наступает в условиях ее недостаточности в больном организме, что и наблюдается при паркинсонизме. Этим объясняется активирующий эффект, обнаруженный нами при действии 1-ДОФА на высокоочищенную лиофилизированную АХЭ [9].

Следует подчеркнуть, что в результате разрушения определенных таламических структур наступает сдвиг в направлении нормализации взаимодействия 1-ДОФА и АХЭ крови, т. е. после оперативного вмешательства так же, как и у здоровых испытуемых, отсутствует эффект активации АХЭ крови препаратом 1-ДОФА. Наши исследования показали также отсутствие активации АХЭ спустя 1,5—2,0 ч после однократного приема больными (до оперативного вмешательства) препарата 1-ДОФА в дозе 50 мг. Эти данные находят подтверждение в работе [5], в которой было отмечено повышение экскреции ДОФА и дофамина как после операции, так и после однократного приема препарата 1-ДОФА.

Полученные результаты свидетельствуют о сходстве механизмов тех компенсаторных сдвигов в функции дофаминергической системы, которые развиваются у больных паркинсонизмом при разрушении определенных структур таламуса или после введения в организм препарата 1-ДОФА.

При паркинсонизме функциональная недостаточность нигростриатных дофаминергических нейронов усугубляется чрезмерной возбуждающей импульсацией, поступающей к этим нервным клеткам от оральных вентральных ядер таламуса (по классификации [17]), что приводит к дополнительному их истощению. Разрушение этой группы таламических ядер исключает патологические таламо-стриатные влияния, что в определенной степени нормализует функциональное состояние дофаминергической системы. Это выражается повышением экскреции ДОФА и дофамина, сдвигом в направлении нормализации взаимодействия 1-ДОФА и АХЭ крови.

Таким образом, феномен активации АХЭ крови препаратом 1-ДОФА может служить дополнительным тестом для диагностики паркинсонизма, контролем за состоянием больных при лечении препаратом 1-ДОФА, а также одним из показателей лечебного эффекта после оперативного вмешательства.

B. A. Roitrub, O. A. Laponogov, N. N. Oleshko, V. A. Cherkes,
Yu. P. Limansky, V. N. Oksamitny, V. I. Tsybalyuk, N. G. Matyuk

CHANGES IN ACTIVITY OF BLOOD ACETYLCHOLINESTERASE UNDER PARKINSONISM

Preparation 1-DOPA is studied for its activating effect with respect to blood acetylcholinesterase both in norm (11 healthy men aged 20-34) and under parkinsonism (19 patients aged 27-63 years). Addition of 1-DOPA ($1.86 \cdot 10^{-3}$ mol) to the blood of patients with parkinsonism evokes activation of acetylcholinesterase (ACE), whereas there is no activation effect in the blood of healthy people and after reception of 50 mg of the 1-DOPA preparation by patients with parkinsonism or after surgical treatment of parkinsonism (cryodestruction of oral ventral thalamic nuclei). Coming from the obtained data the 1-DOPA activation of the blood ACE is recommended as an additional test for diagnosis of parkinsonism, for determination of indications and control of patients' treatment with 1-DOPA and as one of evidences for therapeutic effect in surgical intervention.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev;
Institute of Neurosurgery, Ministry of Public Health,
Ukrainian SSR, Kiev

Список литературы

1. Васин Н. Я., Ильинский И. Я. Эффективность селективной деструкции вентро-оральных ядер зрительного бугра в зависимости от формы паркинсонизма. — В кн.: Лечение паркинсонизма. Современное состояние проблемы. М., 1977, ч. II, с. 60—63.
2. Дядюша Г. П. Ацетилхолинэстераза возбудимых мембран. — Молек. биология, 1976, вып. 15. Биол. мембраны, с. 67—76.
3. Кандель Э. И. Пятнадцатилетний опыт хирургического лечения паркинсонизма. —