

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЗРИТЕЛЬНОГО ГАНГЛИЯ ТИХООКЕАНСКОГО КАЛЬМАРА С НЕКОТОРЫМИ АММОНИЕВЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

БРЕСТКИН А. П., ВИНЯР Т. Н., РОЗЕНГАРТ Е. В.

Субстратная специфичность холинэстеразы зрительного ганглия тихоокеанского кальмара *Todorodes pacificus* по отношению к ряду тиохолиновых эфиров характеризовалась следующими величинами скорости гидролиза ($v_{0.05}$): ацетилтихолин и пропионилтихолин—100, бутирилтихолин—50, ацetyl- β -метилтихолин—170, при близких значениях константы Михаэлиса. Впервые подробно изученное взаимодействие холинэстеразы кальмара с обратимыми аммониевыми ингибиторами показало более низкую чувствительность этого фермента по сравнению с холинэстеразами млекопитающих и лягушки. В ряду амидных производных ацетилхолина (соединения VII—IX), различающихся конфигурацией основного фрагмента структуры молекулы $N-C-C-N^+$ (транс-гош-переход), наиболее активным оказался ингибитор с транс-конформацией (соединение VIII). Эффективность группы дийодметилатов кальмара в отличие от ферментов млекопитающих и лягушки практически не зависела от структуры ацильного радикала.

Холинэстераза нервной ткани играет чрезвычайно важную роль в процессе передачи нервного импульса. Предполагалось, что свойства этого фермента, часто называемого истинной холинэстеразой, должны быть одинаковыми у разных животных. В действительности же этого не наблюдается. Многочисленные исследования убедительно показали, что свойства холинэстераз нервной ткани разных животных существенно различаются [1]. Как и следовало ожидать, кальмары не составили исключения. Локализованные в зрительных ганглиях холинэстеразы нервной системы этих моллюсков различаются как по своей [2—4], так и по чувствительности к фосфорорганическим ингибиторам [3, 4]. Одной из важных особенностей холинэстераз является снижение их каталитической активности под действием аммониевых соединений, которые являются весьма эффективными обратимыми ингибиторами этих ферментов [5]. Однако действие широкого ряда аммониевых соединений на холинэстеразы кальмаров практически не исследовано. Это побудило нас изучить взаимодействие с различными по структуре аммониевыми эффекторами холинэстеразы зрительного ганглия тихоокеанского кальмара *Todorodes pacificus* (старое название *Ommatostrephes sloani-pacificus*). Для этого фермента ранее была исследована субстратная специфичность по отношению к ряду холиновых эфи-

ров и чувствительность к некоторым фосфорорганическим ингибиторам [6—10], а также изучено торможение ферментативного гидролиза ацетилхолина под действием холина и тетраалкиламмониев [11].

Материалы и методы

Ткань зрительных ганглиев 20 особей тихоокеанского кальмара *Todarodes pacificus*, выловленных в августе-сентябре 1980 г. в заливе Петра Великого, хранили в испарителе бытового холодильника. В опытах использовали центрифугат (15 мин при 5000 об/мин) водного гомогената (3 мг/мл).

Субстраты—коммерческие препараты йодидов ацетилтихолина, пропионилтихолина, бутирилтихолина и ацетил- β^2 -метилтихолина («Chemapol», ЧССР).

Ингибиторы—коммерческие препараты йодидов тетраметиламмония и тетраэтиламмония («Chemapol», ЧССР); амидные производные ацетилхолина (соед. VII—X) синтезированы в лаборатории чл.-кор. АМН СССР Н. В. Хромова-Борисова [12]; анабазиновые производные (соед. XI—XV) синтезированы Ю. Р. Хакимовым в Институте биоорганической химии АН УзССР [13].

Активность холинэстеразы определяли методом Ellman [14]. Реакционная смесь объемом 2,0 мл содержала $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) («Koch-Light Lab.», Англия) в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,5, а также растворы субстрата, ингибитора и ферментного препарата. Величину экстинкции определяли в кювете фотоэлектроколориметра ФЭКН-57 в зоне 410 нм при 25°. Измерение количества подвергнутого гидролизу субстрата проводили по калибровочной кривой.

Кинетические параметры гидролиза субстратов (максимальную скорость реакции— V ; константу Михаэлиса— K_m) определяли графическим и аналитическим методами [15]. Эффективность обратимых ингибиторов оценивали по величине обобщенной ингибиторной константы \bar{K}_i [16]. При конкурентном типе торможения $\bar{K}_i = K_i$, при смешанном— $1/\bar{K}_i = 1/K_i + 1/K'_i$, где K_i и K'_i —ингибиторные константы конкурентного и неконкурентного типов торможений.

Результаты и обсуждение

Выше отмечалось, что субстратная специфичность холинэстеразы тихоокеанского кальмара была изучена только с помощью кислородных холиновых эфиров [6—8]. Эти данные достаточно противоречивы (табл. 1). Не ясно, как менялась скорость гидролиза субстратов с удлинением ацильного радикала. По данным Т. М. Турнаева и соавт. [6] и Г. М. Григорьевой [7] скорость гидролиза ацетил- β -метилхолина (соед. IV, X=O) была несколько ниже, чем ацетилхолина (соед. I, X=O).

В табл. 1 приведены наши данные для ряда тиохолиновых субстра-

тов. Ацетилхолин (соед. I) и пропионилтиохолин (соед. II) гидролизывались с одинаковой скоростью, бутирилтиохолин (соед. III)—в 2 раза медленнее, а ацетил- β -метилтиохолин (соед. IV)—в 1,7 раза быстрее. Величины K_m для этих субстратов различались незначительно. Своей столь необычной субстратной специфичностью (высокая скорость гидролиза ацетил- β -метилтиохолина) фермент кальмара напоминала холинэстеразу пчел [1].

Таблица 1

Субстратная специфичность холинэстеразы зрительных ганглиев тихоокеанского кальмара

№ соед.	Формула	X = S			X = 0	
		v , моль/сек/мл	K_m , M	$v_{отн}$	$v_{отн}$	
					[7]	[8]
I	$CH_3C(O)-X-C_2H_4 \overset{+}{N}(CH_3)_3$	$2,2 \cdot 10^{-8}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	100	100	100
II	$C_2H_5C(O)-X-C_2H_4 \overset{+}{N}(CH_3)_3$	$2,1 \cdot 10^{-8}$	$6,4 \cdot 10^{-5}$	100	—	80
III	$C_3H_7C(O)-X-C_2H_4 \overset{+}{N}(CH_3)_3$	$1,1 \cdot 10^{-8}$	$8,2 \cdot 10^{-5}$	50	100	65
IV	$CH_3C(O)-X-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}CH_2 \overset{+}{N}(CH_3)_3$	$3,8 \cdot 10^{-8}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	170	80	—

Примечание. V —максимальная скорость реакции, K_m —константа Михаэлиса; рН 7,5; 25°

Сравнительный анализ скоростей гидролиза холиновых и тиохолиновых эфиров свидетельствует о том, что на каталитической поверхности фермента тихоокеанского кальмара нет столь строгой ограниченности эстеразного центра, как у ацетилхолинэстеразы, и, видимо, отсутствует гидрофобная область в районе эстеразного центра, как у бутирилхолинэстеразы [15].

Изученные обратимые ингибиторы в большинстве своем являются сложными эфирами или амидами карбоновых кислот и содержат в своей молекуле одну или две аммониевые группировки. Неспособность этих соединений подвергаться ферментативному гидролизу была показана в опытах с концентрацией фермента, в 10 раз превышающей ту, при которой измерялась скорость гидролиза ацетилтиохолина [16]. Независимость степени торможения холинэстеразной активности от времени инкубации ингибитора свидетельствовала об обратимом характере торможения. Это дало право изучать соед. V—XV в качестве обратимых ингибиторов холинэстеразного гидролиза ацетилтиохолина.

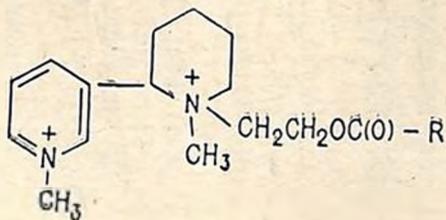
В табл. 2 приведены данные для двух классических обратимых ингибиторов холинэстераз—тетраметиламмония (соед. V) и тетраэтиламмония (соед. VI). Оба иона тормозили активность фермента кальмара

Антихолинэстеразная эффективность ионов тетраалкиламмония
и амидных производных ацетилхолина

№ соед.	Формула	Холинэстераза кальмара			Ацетилхолинэстераза		Бутирилхолинэстераза		Холинэстераза лягушки		
		тип торможения	K_i, M	K_i', M	$p\bar{K}_i$	тип торможения	$p\bar{K}_i$	тип торможения	$p\bar{K}_i$	тип торможения	$p\bar{K}_i$
V	$(CH_3)_4N^+$	К	$5,8 \cdot 10^{-3}$	—	2,25	С	3,50	К	2,45	К	3,05
VI	$(C_2H_5)_3N^+$	К	$2,5 \cdot 10^{-3}$	—	2,59	С	3,40	К	2,72	К	3,00
VII	$CH_3C(O)NHCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$	К	$2,9 \cdot 10^{-3}$	—	2,54	К	2,86	К	3,08	К	2,90
VIII	$CH_3C(O)NCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$	С	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	3,05	К	3,18	К	3,23	С	3,15
IX	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3\text{C(O)N} \quad \text{N}^+(\text{CH}_3)_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2\text{CH}_2 \end{array} $	С	$2,8 \cdot 10^{-2}$	$2,9 \cdot 10^{-2}$	1,85	К	2,53	К	2,52	К	2,48
X	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3\text{C(O)N} \quad \text{NCH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2\text{CH}_2 \end{array} $	С	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	2,15	С	2,39	К	2,56	К	2,48

Примечание. Тип торможения — конкурентный (К); смешанный (С)

Антихолинэстеразная эффективность анабазинных производных



№ соед.	R	Холинэстераза кальмара				Ацетилхолинэстераза		Бутирилхолинэстераза		Холинэстераза лягушки	
		тип торможения	K_i, M	K_i', M	$p\bar{K}_i$	тип торможения	$p\bar{K}_i$	тип торможения	$p\bar{K}_i$	тип торможения	$p\bar{K}_i$
XI	CH ₃	C	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$5,2 \cdot 10^{-4}$	3,84	C	4,46	C	4,32	C	4,20
XII	C ₂ H ₅	C	$2,4 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	3,67	K	5,26	C	4,88	C	4,11
XIII	C ₃ H ₇	C	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	4,02	K	4,23	K	4,28	K	4,16
XIV	C ₄ H ₉	K	$3,3 \cdot 10^{-4}$	—	3,48	C	4,23	K	5,48	K	3,75
XV	CH(CH ₃) ₂	K	$1,4 \cdot 10^{-4}$	—	3,87	K	4,41	C	4,95	C	3,93

Примечание. Тип торможения—конкурентный (K), смешанный (C)

тина наблюдалась для холинэстеразы лягушки [16]. И в случае этой группы соединений чувствительность холинэстеразы кальмара была наименьшей. Так, пропионат (соед. XII) оказался в 40 раз более сильным ингибитором ацetylхолинэстеразы, а валерат (соед. XIV)—в 100 раз более сильным ингибитором бутирилхолинэстеразы.

Обнаруженный факт низкой чувствительности холинэстеразы тихоокеанского кальмара к аммониевым обратимым ингибиторам является в достаточной степени неожиданным. Как по способности катализировать гидролиз холинных эфиров, так и по скорости взаимодействия с катионсодержащими фосфорорганическими соединениями фермент кальмара занимал промежуточное положение между ацetylхолинэстеразой и бутирилхолинэстеразой [5—7]. Видимо, особенности структуры каталитической поверхности холинэстеразы кальмара создают стерические препятствия сорбции обратимых аммониевых ингибиторов.

INTERACTION OF OPTICAL GANGLIA CHOLINESTERASE OF PACIFIC SQUID WITH SOME AMMONIUM COMPOUNDS

BRESTKIN A. P., VINJAR T. N., ROZENGART E. V.

Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Leningrad

The relative rates of hydrolysis of some thiocholine esters in the presence of cholinesterase of squid, *Todarodes pacificus* were as follows: acetylthiocholine and propionylthiocholine—100, butyrylthiocholine—50, acetyl- β -methylthiocholine—170.

The values of K_m were approximately the same. Studied for the first time interaction of squid cholinesterase with a large number of reversible ammonium inhibitors compounds has revealed low inhibitor compared with mammalian and frog cholinesterases, which were studied earlier.

In the series of amide derivatives of acetylcholine (compounds VII—IX) differing in conformation of the main fragment of the molecule $N-C-C-N^+$ (trans-gosh transition), the inhibitor with trans conformation (compound VIII) proved to be the most potent one. The structure of acyl radical of diiodinemethylate derivatives of N-acyloxyethyl-anabasine (compounds XI—XV) doesn't virtually affect the inhibitory power of these substances towards squid acetylcholinesterase in contrast with mammalian and frog enzymes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brestkin A. P., Brick I. L., Grigor'eva G. M. In: Intern. Encyclopedia Pharmacol. Ther., sec. 85, v. 1, Pergamon Press, Oxford—N. Y., p. 241—344, 1973.
2. Бресткин А. П., Одоева Г. А., Шевцов Г. А., Эштейн Л. М. Тез. докл. совещ. «Биол. ресурсы морей Дальнего Востока СССР», Владивосток, 95 с., 1975.
3. Шевова С. П., Бресткин А. П., Несис К. Н., Розенгарт Е. В. Океанология, 19, 481—486, 1979.

4. Григорьева Г. М., Конищева Н. В.—В кн.: Физиология и биохимия морских и пресноводных животных (под ред. Е. М. Крепса), Л., Наука, с. 194—204, 1979.
5. Long I. P. In: *Heifter Handbuch d. exp. Pharmacol*, Berlin, *Ergänzungwerk*, Bd. 15, 374—427, 1963.
6. Турпаев Т. М., Абашкина Л. М., Бресткин А. П., Григорьева Г. М., Розенгарт В. И., Розенгарт Е. В., Сахаров Д. А.—В кн.: Физиология и биохимия беспозвоночных (под ред. Е. М. Крепса), Л., Наука, с. 121—130, 1968.
7. Григорьева Г. М.—В кн.: Ферменты в эволюции животных (под ред. Е. М. Крепса), Л., Наука, с. 177—183, 1969.
8. Боголюбова Г. М., Карпинская Е. В., Куликова А. И., Розенгарт В. И. Биохимия, 37, 826—833, 1972.
9. Розенгарт Е. В.—В сб.: Реакц. способн. орг. соед, IV, 4 (14), 554—562, 1967.
10. Розенгарт Е. В.—В сб.: Реакц. способн. орг. соед, V, 1, 227—234, 1968.
11. Курприянов В. А., Куликова А. И., Розенгарт В. И. Биохимия, 38, 6, 1261—1265, 1973.
12. Хромов-Борисов Н. В., Данилов А. Ф., Бровцына Н. Б., Александрова Л. Н., Инденбом М. Л. ДАН СССР, 230, 1250—1253, 1976.
13. Хакимов Ю. Р., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В., Абдувахабов А. А., Садыков А. А., Асланов Х. А. ДАН УзССР, 1, 45—47, 1978.
14. Ellman G. H., Countney R. D., Anders V., Feather K. M. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 2, 88—95, 1961.
15. Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахабов А. А., Асланов Х. А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Фан, Ташкент, 1976.
16. Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Розенгарт Е. В. Биохимия, 46, 1042—1048, 1981.
17. Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Данилов А. Ф., Розенгарт Е. В., Тез. докл. III Всесоюзн. конф. «Физиология и биохимия медиаторных процессов», М., с. 32, 1980.

Институт эволюционной
физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова АН СССР,
Ленинград

Поступила 5. X 1981