

УДК 577.152.311+547.937.577.112.823

## ВЛИЯНИЕ БИЛИРУБИНА И СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА НА АКТИВНОСТЬ АХЭ В СИНАПСОСМНОЙ МЕМБРАНЕ

Ткаченко А.В.

Институт биологической физики АН СССР, Пуцзино

Спектр поглощения света, характерный для находящегося в водной среде свободного билирубина с единственным максимумом при 440 нм и плечом в области 410—420 нм, при связывании пигмента синапсосмной мембраной *in vitro* преобразуется в спектр с двумя последовательно возникающими в ходе спектрофотометрического титрования максимумами в области 460 и 500 нм. Обнаружили два типа центров связывания билирубина в мембранных частицах, отличающихся друг от друга величиной константы ассоциации (для центров этих двух типов константа ассоциации составляет соответственно  $0,6 \cdot 10^5$  и  $0,2 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$ ) и максимальным количеством связываемого ими билидиена (в расчете на общее количество мембранных белков соответственно 5,0 и 7,0 нмоль/мг). Возникновение максимума в области 460 нм какими-либо изменениями У.А. мембранной АХЭ не сопровождается. Возникновение максимума в области 500 нм сопровождается небольшим уменьшением активности фермента. Уменьшение активности АХЭ при инкубации частиц синапсосмной мембраны в присутствии билирубина в темноте (рН 7,2 при  $10^\circ$ ) происходит в течение 2—2,5 ч. Более быстрое и более значительное понижение У.А. мембранной эстеразы вызывает облучение суспензии мембранных частиц синим светом ( $\lambda_{\text{max}}$  450—460 нм) в присутствии билирубина (рН 7,2 при  $10^\circ$ ). Существенное влияние на изменение активности синапсосмной АХЭ при указанном облучении оказывает добавление сывороточного альбумина в инкубационную среду. Интенсивность и направленность этого влияния зависят от некоторых особенностей химического состава используемого препарата сывороточного белка и от водородного показателя среды.

\* \* \*

Билирубиновая энцефалопатия при желтухе недоношенных новорожденных детей связана с накоплением билирубина (БР) в головном мозгу, в частности в его базальных ганглиях, содержащих сравнительно высокую концентрацию АХ [1] и обладающих сравнительно высокой активностью АХЭ [2]. Накопление билидиена в мозгу сопровождается повреждением нервных клеток. Применяемая при желтухе недоношенных новорожденных фототерапия [3] нередко оказывается причиной возникновения у детей серьезных осложнений [4], некоторые из которых свидетельствуют о происходящих при фотолечении функциональных нарушениях в НС, охватывающих, в частности, холинергические механизмы внешней секреции. В связи с этим задача данного исследования заключалась в изучении активности АХЭ в синапсосмной мембране (СМ) при связывании БР плазматической мембраной изолированных нервных окончаний и при

имитации фототерапевтического воздействия *in vitro* облучением видимым светом содержащих желчный пигмент мембранных частиц. Кроме того, изучали влияние на активность АХЭ в содержащей билидиен нейрональной мембране сывороточного альбумина, который *in vivo* служит основным транспортером БР в системе циркуляции, причем связывание БР альбумином так же, как и связывание пигмента частицами СМ *in vitro*, зависит от водородного показателя среды [5].

### Материалы и методы

В опытах использовали крыс-самцов линии *Wistar* массой 180—200 г. Методы получения фракции СМ из гомогената головного мозга животных в 0,32 М сахарозе, определения общего содержания мембранных белков в получаемых препаратах, количественного определения сывороточного альбумина, контроля за чистотой использованных препаратов БР («Реахим», СССР или «Reanal», Венгрия), выделения нужного для работ IX $\alpha$ -изомера желчного пигмента и приготовления водных растворов этого изомера, а также методы спектрофотометрического титрования растворов БР суспензией мембранных частиц в видимой области спектра и получения препаратов СМ, содержащей связанный ею БР, описаны ранее [5]. Сывороточный альбумин человека (САЧ), полученный в Центральном институте гематологии и переливания крови МЗ СССР (Москва), очищали от связанных им высших жирных кислот и прочих органофильных лигандов [6]. Контрольные определения, проводимые экстракционным методом [7], колориметрическим методом [8] и методом ТСХ [9] на пластинах «Silufol» («Cavalier», ЧССР) с проявлением хроматограмм 0,25%-ным спиртовым раствором роданина 6G (50—60°) показали, что общее содержание жирных кислот в исходном препарате САЧ (неочищенного) составляло 3,8 в расчете на массу белка, а после указанной очистки не превышало 0,002 моль/моль (в эквивалентах пальмитиновой кислоты). Мономерный белок из неочищенного или очищенного САЧ получали либо химическим методом [10], либо препаративным электрофорезом в ПААГ, используя разработанную в ИБФ АН СССР модификацию камеры для вертикального фореа.

Активность АХЭ или холинэстеразы (ХЭ) в препаратах СМ определяли по гидролизу АХ, ацетил- $\beta$ -метилхолина (мехолила) или бутирилхолина при инкубации мембранных частиц в растворах перечисленных соединений. Инкубационная смесь (3 мл) представляла собой  $(1-3) \cdot 10^{-3}$  М йодид АХ, йодид мехолила или йодид бутирилхолина («Serva», ФРГ) в 0,05М трис-НСI буфере (рН 7,2 при 37°). В этот раствор вводили порцию суспензии частиц СМ, содержащую 600—800 мкг мембранных белков. Затем смесь инкубировали в темноте в течение 30 мин при 37°. По завершении инкубации в смесь добавляли 1 мл 25%-ного раствора ТХУ и центрифугировали (10<sup>5</sup>g, 30 мин, 0°). В надосадочной жидкости до и после инкубации определяли содержание АХ, мехолила или бутирилхолина

колориметрическим методом [11]. Как правило, активность ХЭ, специфическим субстратом которой в данном случае служил бутирилхолин, в препаратах СМ практически отсутствовала. Препараты мембранных частиц, в которых активность ХЭ оказывалась ощутимой, подвергали предварительной обработке 0,1 мМ диизопропилфторфосфатом в течение 5—10 мин для практически полного избирательного подавления активности этого фермента [12]. У.А. АХЭ выражали количеством (мкмоль) АХ или мехолила, служившего специфическим субстратом для данного фермента, гидролизованых в течение 1 мин инкубации в расчете на 1 мг мембранных белков.

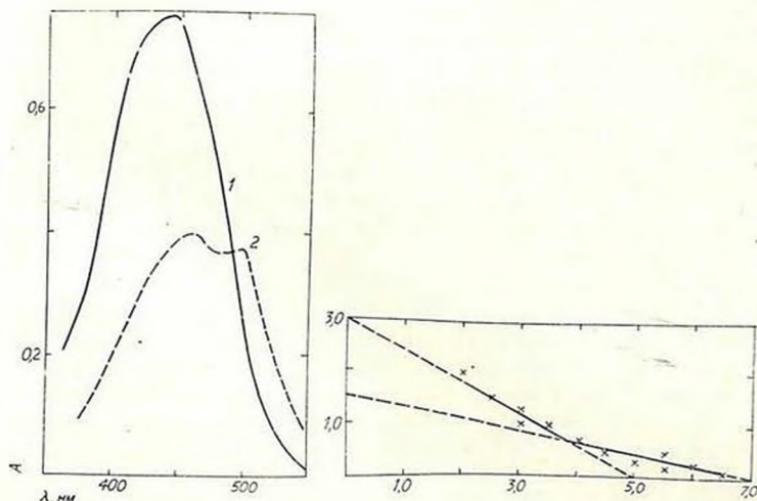
Для имитации фототерапевтического воздействия *in vitro* в стеклянную термостатированную при  $10 \pm 2^\circ$  ячейку диаметром 40 мм и объемом 5 мл отмеривали 3 мл суспензии мембранных частиц (общая концентрация мембранных белков 2,8—3,0 мг/мл) в 0,9%-ном растворе NaCl на 0,1М трис-HCl буфере (рН 7,2 при  $10^\circ$ ). Высота столба суспензии в ячейке составляла 3—4 мм. В ячейку через закрываемое отверстие в крышке диаметром 2 мм добавляли 1 мл  $10^{-4}$  М БР в 0,9%-ном растворе NaCl на 0,1 М трис-HCl буфере (рН 7,2 при  $10^\circ$ ). Через 30 мин преинкубации постоянно перемешиваемой суспензии частиц СМ в темноте при  $10^\circ$  (для выравнивания температуры и связывания БР мембранными частицами) ячейку, плотно закрытую крышкой, устанавливали на алюминиевую фольгу, покрывавшую рабочую поверхность магнитной мешалки. Через отверстие в крышке отбирали порции суспензии для определения исходной активности мембранного фермента, после чего приступали к облучению постоянно перемешиваемого содержимого термостатированной ячейки. Для облучения использовали люминесцентную лампу ЛГ-40 с максимумом излучения в области 450—460 нм. Облучаемую ячейку устанавливали на расстоянии 10—15 см от источника света в постоянном потоке воздуха от вентилятора. Общая продолжительность непрерывного облучения составляла 1,5—2 ч. Через каждые 15 мин облучения из ячейки отбирали по 300—400 мкл для определения активности АХЭ, смешивая отобранные порции с упомянутой инкубационной средой.

В другой серии опытов после 30-минутной темновой преинкубации суспензии частиц СМ в присутствии БР непосредственно перед началом облучения в нее добавляли раствор САЧ в 0,9%-ном растворе NaCl на 0,1М трис-HCl буфере (рН 7,2 при  $10^\circ$ ) до конечной концентрации  $10^{-5}$ М. В контрольных опытах активность АХЭ в мембранных частицах определяли после 30-минутной темновой преинкубации и при последующей 2-часовой инкубации в темноте ( $10^\circ$ ) без добавления БР, после добавления БР, после добавления САЧ к интактным или к содержащим БР частицам СМ. Кроме того, в контрольных опытах определяли активность мембранной эстеразы при облучении (после 30-минутной темновой преинкубации) частиц СМ без добавления БР или после добавления САЧ без БР. Активность фермента определяли также в суспензии содержащих БР мембранных частиц после барботирования ее аргоном в течение 2 ч

в темноте.

В основной серии опытов водородный показатель инкубационной среды в ячейке составлял 7,2 ( $10^\circ$ ). В дополнительных сериях опытов перед началом облучения среду подкисляли до pH 6,8 при  $10^\circ$  или, напротив, подщелачивали до pH 7,8 при  $10^\circ$ .

Спектры поглощения измеряли на регистрирующих спектрофотометрах «Specord» (ГДР) и «Perkin-Elmer», модель 575 (США). Спектры флуоресценции измеряли на скорректированном регистрирующем спектрофлуорометре «Perkin-Elmer MPF-44B» (США). Для центрифугирования использовали угловой ротор центрифуги ЦЛР-1 (СССР) и бакет-ротор препаративной ультрацентрифуги «VAC-60» (ГДР).



**Рис. 1.** Спектры поглощения света свободными (1) и связанными частицами синапсомной мембраны (2) билирубином в 0,9%-ном растворе NaCl на 0,1 М трис-HCl буфере (pH 7,2 при  $20^\circ$ ). По оси абсцисс — длина волны, по оси ординат — оптическая плотность

**Рис. 2.** Результаты спектрометрического титрования суспензии частиц синапсомной мембраны раствором билирубина ( $4 \cdot 10^{-5}$  М, pH 7,2 при  $20^\circ$ ). По оси абсцисс — связанный БР (нмоль/мг белка), по оси ординат — связанный БР (нмоль/мг белка)/свободный БР  $\cdot 10^{-5}$  М

Результаты экспериментов обрабатывали статистически, оценивая достоверность разницы сравниваемых средних арифметических величин с помощью t-критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Связывание БР частицами СМ при спектрофотометрическом титровании в видимой области спектра суспензией мембранных частиц раствора желчного пигмента в 0,9%-ном растворе NaCl на 0,1 М трис-HCl буфера (рН 7,2 при 20°) сопровождается преобразованием спектра поглощения света с единственным максимумом при 440 нм и плечом в области 410—420 нм, характерного для свободного БР в водной среде, в спектр с двумя максимумами в области 460 и 500 нм, характерный, как установлено в данном исследовании, для БР, связанного СМ (рис.1). При выражении результатов титрования (изменение весового соотношения БР и общего содержания мембранных белков в пределах от 0,02 до 1,0 при 20°, рН 7,2) в представленных на рис.2 координатах Скетчарда [13] удалось выявить 2 типа центров связывания БР. На рис.2 видно, что в центрах одного типа максимальное связывание БР мембранными частицами составляет 5,0, а в центрах второго типа—7,0 нмоль на 1 мг общего содержания мембранных белков. Величина  $K_d$  составляет соответственно  $0,6 \cdot 10^5$  и  $0,2 \cdot 10^5 M^{-1}$ .

Связывание БР частицами СМ сопровождается небольшим усилением возбуждаемой при 430 нм флуоресценции пигмента (рис.3) с максимумом в области 530—540 нм (рН 7,2, 10°). Флуоресценция свободного БР в водной среде в указанных условиях ничтожна. При добавлении к суспензии хранившихся в течение 12—24 ч при 18—20° или при 0—7° под защитой от дневного света окрашенных билидиеном частиц СМ избытка САЧ спектр поглощения связанного мембранными частицами БР преобразуется в характерный для связанного с САЧ пигмента спектр с исчезновением упомянутого максимума в области 500 нм с сохранением максимума в области 460 нм (оптическая плотность в этой области значительно возрастает) и с небольшим плечом в области 430 нм. Интенсивность флуоресценции пигмента, «снятого» САЧ с частиц СМ значительно повышается с максимумом в области 520 нм (возбуждение флуоресценции при 430 нм). Результаты этих экспериментов позволяют считать, что связывание БР частицами СМ и хранение содержащих билидиен мембранных частиц в указанном режиме, по-видимому, не сопровождается заметными изменениями химической природы желчного пигмента.

В свежих интактных частицах СМ величина У.А. АХЭ составляла  $10,1 \pm 0,3$  (по АХ) или  $2,8 \pm 0,1$  (по мехолилу). После инкубации мембранных частиц без каких-либо добавок или в присутствии САЧ ( $3 \cdot 10^{-5} M$ ) в течение 2,5 ч в темноте (рН 7,2, 10°) величина У.А. АХЭ составляла соответственно  $9,7 \pm 0,4$  (по АХ) или  $2,9 \pm 0,1$  (по мехолилу).

В ходе спектрофотометрического титрования при постепенном формировании упомянутого максимума в области 460 нм У.А. АХЭ в частицах СМ оставалась практически без изменений. При последующем формировании второго максимума в области 500 нм (рис.3) У.А. мембранного фермента понижалась в среднем на 1,8—2,5% ( $p < 0,05$ ) в сравнении

с ферментной активностью в свежих интактных частицах СМ.

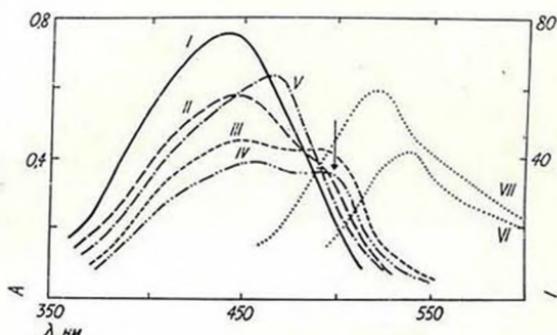
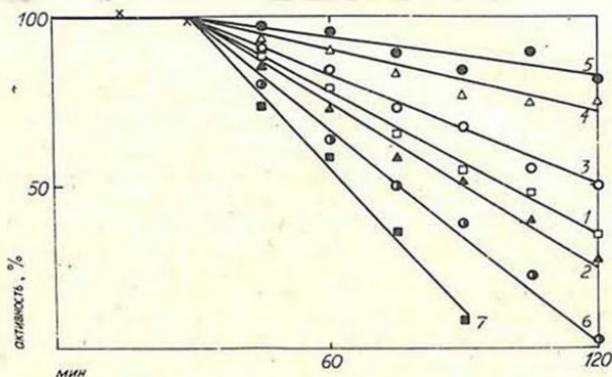


Рис.3.Спектры поглощения света и флуоресценции БР при титровании раствора билирубина суспензией частиц синапсомембраны. I-спектр поглощения  $1,4 \cdot 10^{-5}$ М билирубином в 0,9%-ном растворе NaCl на 0,1 М фосфат-цитратном буфере (рН 7,2, 20°); II—IV - то же (2 мл) после добавления суспензии мембранных частиц до конечной концентрации мембранных белков в пробе соответственно 18, 45 и 315 мкг/мл (максимальное разбавление пробы в 1,05 раза); V - спектр поглощения IV после добавления 100 мкл  $7 \cdot 10^{-4}$ М сывороточного альбумина человека (рН 7,2, 20°); VI - спектр флуоресценции билирубина, связанного мембранными частицами (рН 7,2, 20°); VII - то же после добавления избытка сывороточного альбумина человека. Стрелкой указан момент начала уменьшения величины У.А. АХЭ в ходе спектрофотометрического титрования. По оси абсцисс — длина волны (нм), по оси ординат слева — оптическая плотность, справа — интенсивность флуоресценции (отн.ед.)

Величина У.А. АХЭ практически не отличалась от активности фермента в свежих интактных мембранных частицах после 30 мин темновой преинкубации частиц СМ (рН 7,2, 10°), содержащих БРЗ  $\cdot 10^{-5}$ М). Аналогичный результат получили при 30-минутной преинкубации содержащих БР частиц СМ в присутствии САЧ ( $3 \cdot 10^{-5}$ М). Через 2 ч темновой инкубации содержащих билидиен мембранных частиц У.А. АХЭ оказывалась пониженной в среднем на 6—8% ( $p < 0,05$ ). При подщелачивании среды до рН 7,2, 10° перед началом темновой инкубации в течение 2 ч (после 30-минутной преинкубации содержащих БР частиц СМ) У.А. АХЭ по завершении инкубации оказывалась пониженной в среднем на 4% ( $p < 0,01$ ) в сравнении с ферментной активностью в свежих интактных мембранных частицах.

После облучения интактных частиц СМ без каких-либо добавок или в присутствии САЧ ( $3 \cdot 10^{-5}$ М) в течение 2 ч после 30-минутной темновой преинкубации У.А. АХЭ практически не отличалась от ферментной активности в свежих интактных мембранных частицах. При облучении суспен-

зии содержащих БР частиц СМ (рН 7,2, 10°) У.А. АХ в течение первых 30 мин оставалась практически без изменений, но затем понижалась и через 120 мин оказывалась пониженной в среднем на 67% ( $p < 0,01$ ) в сравнении с ферментной активностью в свежих интактных частицах СМ (рис.4). При подщелачивании среды до рН 7,8, 10° перед началом облучения У.А. АХЭ в течение первых 30 мин также оставалась без изменений, но через 120 мин облучения оказывалась пониженной в среднем на 48—52% ( $p < 0,01$ ). У.А. АХЭ в содержащих БР частицах СМ через 2 ч облучения после барботирования суспензии мембранных частиц (рН 7,2, 10°) аргоном составляла  $9,3 \pm 0,80$  (по АХ), то есть практически не отличалась от активности этого фермента, находимой после 30-минутной преинкубации суспензии содержащих билидиен частиц СМ в темноте без предварительного барботирования и без последующего облучения.



**Рис.4.** Изменения У.А. АХЭ в содержащих билирубин частицах синапсомной мембраны при облучении их синим светом. 1 — облучение без добавления сывороточного альбумина (рН 7,2, 10°); 2 — облучение в присутствии мономерного неочищенного сывороточного альбумина (рН 7,2, 10°); 3 — облучение без добавления сывороточного альбумина при рН 7,8 10°; 4 — облучение в присутствии мономерного неочищенного сывороточного альбумина при рН 7,8, 10°; 5 — облучение в присутствии мономерного очищенного сывороточного альбумина при рН 7,8, 10°; 6 — облучение без добавления сывороточного альбумина при рН 6,8, 10°; 7 — облучение в присутствии мономерного неочищенного сывороточного альбумина при рН 6,8, 10°. Каждая точка на графике представляет собой среднюю арифметическую величину для результатов 5—6 опытов. За 100% принята ферментная активность в свежих интактных частицах синапсомной мембраны. По оси абсцисс — время облучения (мин), по оси ординат — остаточная активность АХЭ (%)

На рис.4 видно, что падение У.А. АХЭ, вызываемое облучением содержащих БР мембранных частиц при рН 7,2, 10° в присутствии мономерного неочищенного САЧ происходило быстрее, чем это имело место при облучении без добавления САЧ. После защелачивания суспензии

содержащих желчный пигмент частиц СМ до рН 7,8, 10° (перед облучением) падение У.А. АХЭ, вызываемое облучением, в присутствии САЧ, напротив, существенно замедлялось: через 2 ч облучения при рН 7,8 в присутствии САЧ величина У.А. АХЭ составляла  $7,0 \pm 0,01$  (по АХ) или  $2,0 \pm 0,01$  (по мексолиду), то есть оказывалась пониженной в среднем на 25—30% ( $p < 0,01$ ). При использовании же мономерного очищенного САЧ наблюдали более значительное, чем это имело место при использовании мономерного неочищенного САЧ, замедление вызываемого облучением содержащих БР мембранных частиц, если водородный показатель среды составлял 7,8 (10°). При рН 7,2 разница эффектов, связанная с указанной особенностью химического состава препарата сывороточного белка, также имела место, но была менее значительной, чем при рН 7,8.

Наиболее быстрое уменьшение У.А. АХЭ в содержащих билидиен частицах СМ, вызываемое облучением их синим светом, наблюдали после закисления среды (до начала облучения) до рН 6,8 (10°). В этих же условиях отмечали наиболее сильный потенцирующий эффект добавления мономерного неочищенного САЧ в отношении вызываемого падения активности мембранной эстеразы действия облучения (рис.4).

Обнаруженный при взаимодействии БР с СМ сдвиг максимума поглощения света пигментом в область 460 нм обусловлен, вероятно, внедрением билидиена в гидрофобные (возможно, липидные) участки мембраны [14—16], тогда как формирование максимума в области 500 нм обусловлено, по-видимому, димеризацией и агрегацией молекул пигмента на мембранных частицах [17].

Обнаруженное понижение активности АХЭ при этом обусловлено, быть может, накоплением билидиена в гидрофобном окружении активных центров фермента, которое, как полагают [18], представляет собой не сплошное обрамление, а отдельные включения на каталитической поверхности фермента. Не исключено, что именно этим объясняется то обстоятельство, что для заметного понижения активности АХЭ оказывается необходимым достаточно большое накопление БР, димеризация и агрегация его молекул в мембранных частицах, сопровождающиеся формированием максимума поглощения света билидиеном в области 500 нм, или достаточно продолжительная инкубация последних в присутствии желчного пигмента. Понижение активности АХЭ при взаимодействии СМ с БР в какой-то мере может быть обусловлено способностью билидиена прочно связывать такие металлы, как  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ , оказывающие стимулирующее влияние на активность этого фермента [19].

Добавление САЧ в инкубационную среду при темновой инкубации содержащих БР частиц СМ не устраняло подавляющего активность АХЭ действия БР, несмотря на весьма высокое сродство этого сывороточного белка к желчному пигменту (константа ассоциации  $10^8$ — $10^{11} M^{-1}$ ). Это обусловлено, возможно, тем, что полное извлечение билидиена сывороточным альбумином из частиц происходит очень медленно (в течение 1,5—2 ч)

вне зависимости от указанного высокого значения константы ассоциации [5], найденного при взаимодействии альбумина и БР в гомогенных водных растворах. Приходится, кроме того, считаться с принципиально возможным взаимодействием сывороточного альбумина с мембранными ганглиозидами [20].

Более значительное и быстрое уменьшение У.А. АХЭ, вызываемое облучением синим светом суспензии содержащих БР частиц СМ, обусловлено, вероятно, фотодинамической активностью связанного с частицами клеточной мембраны БР [4], образованием продуктов сопряженного с фотодинамической активностью желчного пигмента пероксидирования ненасыщенных мембранных липидов. Такие продукты (например, альдегиды) способны оказывать повреждающее действие на клеточную мембрану [21]. Такому толкованию полученных результатов соответствует обнаруженное в данной работе противодействие вызываемому облучением содержащих БР частиц СМ понижению активности АХЭ барботированием суспензии мембранных частиц аргоном перед началом облучения, создававшим определенный дефицит кислорода в инкубационной среде. Происходящее при фотодинамической активности БР фотоокисление пигмента представляет собой самовозбуждающийся процесс, для осуществления которого необходимо присутствие синглетного кислорода [22]. В условиях же относительного дефицита кислорода БР может функционировать в качестве антиоксиданта [23].

Оптимальный для связывания БР частицами СМ ( $10^\circ$ ) водородный показатель среды составляет 6,8—7,2 [5]. Замедление вызываемого облучением мембранных частиц, содержащих желчный пигмент, уменьшения активности АХЭ при рН 7,8,  $10^\circ$  (в сравнении с тем, что имело место при рН 7,2) обусловлено, возможно, высвобождением БР из мембранных частиц в окружающую их водную среду [5]. Фотодинамический эффект БР может оказывать лишь при связывании пигмента либо молекулами биополимеров, либо клеточной мембраной, тогда как свободный билидин в водной среде фотодинамического действия не оказывает [4].

Более сильное замедление падения активности АХЭ, вызываемое облучением содержащих БР частиц СМ, при добавлении мономерного очищенного САЧ или (в меньшей мере) мономерного неочищенного САЧ в суспензию мембранных частиц, подщелоченную перед началом облучения до рН 7,8 при  $10^\circ$  обусловлено, по-видимому, тем, что при данном водородном показателе среды высвобождение билидина из частиц СМ стимулировалось связыванием высвобождающегося пигмента добавляемым альбумином. В этих условиях, кроме того, происходило, вероятно, энергичное связывание альбумином не только БР, но и альдегидов, образующихся при упомянутом пероксидировании ненасыщенных мембранных липидов. При рН 7,8 имеет место достаточная степень депротонирования  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-групп некоторых лизиновых остатков в составе САЧ, вступающих во взаимодействие с альдегидами [24]. При рН 7,2 и тем более при 6,8 степень

депротонирования таких групп оказывалась, по-видимому, недостаточной для ощутимого связывания ими продуктов перекисидирования. Поэтому, видимо, замедляющий вызываемое облучением падение активности АХЭ в содержащих БР частицах СМ эффект добавления мономерного очищения САЧ оказывался сравнительно слабым при рН 7,2 и еще более слабым при рН 6,8. Добавление мономерного неочищенного САЧ в суспензию содержащих билирубин мембранных частиц при рН 7,2 или при 6,8 даже потенцировало вызываемое облучением понижение активности АХЭ. Такой неожиданный эффект, помимо всего прочего, обусловлен, возможно, дополнительным к происходившему при облучении перекисидированию мембранных липидов перекисидированием ненасыщенных жирных кислот в составе извлекавшего какое-то количество БР из мембранных частиц неочищенного сывороточного альбумина [25] и, следовательно, более интенсивным накоплением повреждающих клеточную мембрану продуктов перекисидирования.

### INFLUENCE OF BILIRUBIN AND SERUM ALBUMIN ON ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN SYNAPTOSOMAL MEMBRANE

Тkachenco A.V.

*Institute of Biophysics, USSR Academy of  
Sciences, Pushchino, Moscow Region*

Absorption spectrum of bilirubin (BR) aqueous solution with a single maximum at 440 nm and shoulder in the 410—420 nm spectral region is transformed into a spectrum with two maxima in the 460 and 500 nm region (sequentially appearing in the process of spectrophotometric titration), when the pigment binds with synaptosomal membranes (SM) *in vitro*. Two types of BR binding centres were detected in membrane particles, which differ in  $K_a$  ( $0,6 \times 10^5$  and  $0,2 \times 10^5 M^{-1}$ ) and in binding capacity (0,5 and 0,7 nmoles per mg of total membrane protein). The appearance of maximum at 460 nm is not accompanied by any alterations of AChE specific activity, appearance of the maximum at 500 nm leads to a slight decrease in the enzyme activity. When SM particles are incubated with BR in the dark (pH<sub>10</sub> 7,2) AChE specific activity decreases during 2,0—2,5 hours. Blue light illumination of BR-containing aqueous suspension of membrane particles ( $\lambda_{max}$  450—460 nm) results in a more prominent decrease in the enzyme activity. The addition of serum albumin to the incubation medium significantly affects BR-related changes in AChE activity of synaptosomes. Extent and direction of these effects depend on pH and presence of minor ligands bound to the molecule of serum albumin.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Bachelard H.S.* Brain biochemistry, p.33, Chapman and Hall, London, New York, 1981.
2. *Butcher L.L., Wolf N.J.* — In: Handbook of Chemical neuroanatomy (ed. A. Bjorklind, T. Hokfelt, M.J. Kuhar), v.3, p.33—34, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984.
3. *Далецкий С.Я., Гаариюшов В.В., Матвеев М.Ш., Аюпян В.Г., Рошаль Л.М.* Диагностика и лечение неотложных состояний у детей, М., Медицина, 1977.
4. *Мышкин А.Е., Сахаров В.Н.* Успехи химии, т.51, вып.1, с.72—91, 1982.
5. *Ткаченко А.В.* *Вопр. мед. химии*, т.33, N 6, с.74—78, 1987.
6. *Ткаченко А.В., Емельяненко В.И.* Способ очистки альбумина плазмы крови. Авторское свидетельство N 1312947 (не публ., Б.И. N19, 1987)
7. *Ткаченко А.В., Горин В.П.* Экстракт. Авторское свидетельство N 1281280.
8. *Weigel W.* Die Pharmazie, N 12, S.786—791, 1956.
9. *Moreau R.A., Huang A.H.S.* Arch. Biochem. Biophys., v.194, N2, p.422—430, 1979.
10. *Ткаченко А.В.* Способ получения мономерного альбумина плазмы крови. Авторское свидетельство № 1250301.
11. *Hestrin Sh.* J. Biol. Chem., v.180, N1, p.249—261, 1949.
12. *Brzin M., Sketilj J., Klinar W.* — In: Handbook of neurochemistry (ed. A. Lajtha), v.4, p.252, 260, 263, Plenum Press, New York, London, 1983.
13. *Frezza M., Tiribelli C., Panfili E., Sandri G.* FEBS Lett., v.38, N 2, p.125—128, 1974.
14. *Nagaoka Sh., Cowerer M.L.* J. Biol. Chem., v.253, N 6, p.2005—2011, 1978.
15. *Kashiwamata Sh., Asai M., Semba R.K.* J. Neurochem., v.36, № 3, p.826—829, 1981
16. *Nemat-Gorgani M., Meisami E.* J. Neurochem., v.32, N 3, p.1027—1032, 1979.
17. *Wolkoff A.W., Chowdhary J.R., Arias Ir.M.* — In: The metabolic basis of inherited disease (ed. J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, J.L. Goldstein, M.S. Brown), p.1389, McGraw-Hill Book Company, New York, 1983.
18. *Садыков А.С., Розенгарт Е.В., Абдувахов А.А., Асланов Х.А.* — В кн.: Холинэстеразы. Активный центр и механизмы действия, с.146—147, ФАН, Ташкент, 1976.
19. *Dowson R.M., Crone H.D.* J. Neurochem., v.21, № 1, p.247—249, 1973.
20. *Tomasi M., Roda G., Ausiello C., D Agnolo G., Venerado B., Ghidoni R., Sonnio S., Tettamanti G.* Eur. J. Biochem., v.111, № 2, p.315—324, 1980.
21. *Girotti A.W.* Biochemistry, v.14, N 15, p.3377—3383, 1975.
22. *McDonagh A.F.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v.44, N 6, p.1306—1311, 1971.
23. *Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N.* Science, v.235, № 4792, p.1043—1046, 1987.
24. *Lundblad R.L., Noyes C.M.* — In: Chemical reagents for protein modification, p.56, 127, Boca Ration, CRC Press, Florida, 1984.
25. *Tappel A.L.* Federat. Proc., v.32, N 8, p.1870—1874, 1973.

Поступила 2.11.1988