

15. Shlman R., Akino N., Kaufman S. J. Biol. Chem., v. 246, p. 1330—1334, 1971.
16. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
17. Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
18. Krnjevic K.—In: GABA in Nervous System Function (eds. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower), p. 269—281, Raven Press, New York, 1976.
19. Obata K.—In: GABA in Nervous System Function (eds. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower), p. 283—286, Raven Press, New York, 1976.
20. Ковалев Г. Н., Хетев Л. Нейрохимия, т. 2, с. 315—318, 1983.
21. Pastuszko A., Willson D. F., Eresinsca M. J. Biol. Chem., v. 257, p. 7514—7520, 1982.

Поступила 28. XII 1985

УДК 577.159

СУБСТРАТНО-ИНГИБИТОРНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ КОМАНДОРСКОГО КАЛЬМАРА

БРЕСТКИН А. П., КОВАЛЕВ И. Н., РОЗЕНГАРТ Е. В.,
ХОВАНСКИХ А. Е., ФЕДОРЕЦ Ю. А., ЭПШТЕЙН Л. М.

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

Изучена субстратная и ингибиторная специфичность холинэстеразы (ХЭ) зрительных ганглиев командорского кальмара (*Berytheutis magister*). С помощью набора специфических тioxолиновых субстратов и фосфорорганических ингибиторов (ФОИ) показано, что холинэстеразная активность обусловлена действием одного фермента. Отмечено, что ХЭ командорского кальмара по чувствительности к некоторым гидрофобным ФОИ отличается от ХЭ тихоокеанского (*Todarodes pacificus*), что подтверждает представления о видоспецифичности ХЭ кальмаров. Впервые изучено действие на ХЭ командорского кальмара ФОИ, содержащих ацетиленовую группировку. Величина «ацетиленового эффекта» существенно зависела от структуры ФОИ.

Как отмечалось ранее [1, 2], у кальмаров свойства ХЭ существенно зависят от их видовой принадлежности и условий обитания. В этой связи свойства ХЭ командорского кальмара, которые до сих пор практически не изучены, представляют особый интерес. В отличие от других видов дальневосточных кальмаров командорский кальмар имеет наиболее высокоширотный ареал обитания. Весь его жизненный цикл проходит при средней температуре воды 2—4°. Он ведет придонный образ жизни и значительно менее подвижен, чем пелагические виды, такие как тихоокеанский кальмар или кальмар Бартрама. Можно предположить, что эти особенности биологии вида должны сказаться на функционировании ЦС, а значит и на свойствах ХЭ нервной ткани.

В настоящей работе приведены свидетельства в пользу того, что холинэстеразная активность в зрительных ганглиях командорского

кальмара обусловлена действием одного фермента, получены данные о его субстратной специфичности и о взаимодействии этого фермента с различными по структуре ФОИ. В связи с тем, что среди дальневосточных кальмаров, обитающих в северной акватории Тихого океана, наиболее изучены свойства ХЭ зрительных ганглиев тихоокеанского кальмара [3], проведено сопоставление характеристик ХЭ нервной ткани командорского и тихоокеанского кальмаров.

Материалы и методы

Зрительные ганглии командорского кальмара извлекали из особей обоего пола III—IV стадии зрелости, выловленных в районе Северо-Курильских островов. В качестве ферментного препарата ХЭ использовали центрифугат (5000 об/мин) водного гомогената (3 мг/мл) ткани предварительно замороженных зрительных ганглиев. Активность ХЭ определяли колориметрическим методом Ellman и соавт. [4] (рН 7,5; 25°). В качестве субстратов использовали ацетилтихохолинбромид (АТХ), пропионилтихолинбромид (ПрТХ) и бутирилтихолинйодид (БуТХ) фирмы «Chemapol» (ЧССР). Изучены ФОИ, синтезированные в Институте элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова АН СССР [5].

Результаты и обсуждение

Идентификация ХЭ. Известно, что мозг млекопитающих содержит две ХЭ. Нервная ткань некоторых видов кальмаров по содержанию ХЭ также оказалась гетерогенной [6, 7], поэтому необходимо было ответить на вопрос, ответствен ли за холинэстеразную активность нервной ткани командорского кальмара один фермент или здесь присутствует смесь ХЭ? Одним из надежных способов такой проверки является субстратно-ингибиторный метод [8]. В опытах были использованы четыре ФОИ, существенно отличающиеся друг от друга по строению (табл. 1) и обладающие различной избирательностью ингибирую-

Таблица 1

Исследование однородности холинэстеразной активности в ткани зрительных ганглиев командорского кальмара с использованием специфических субстратов и фосфорорганических ингибиторов (K_{II} , $M^{-1} \text{ мин}^{-1}$; 25°; рН 7,5)

N соединения	Ингибиторы	С у б с т р а т ы		
		ацетилтихохолин	пропионилтихолин	бутирилтихолин
I	$((CH_3)_2CHO)_2P(O)F$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(8,0 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(9,5 \pm 0,2) \cdot 10^6$
II	$C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_2H_4SCH_3C_2H_5$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^7$
III	$(C_2H_5O)_2P(O)SC \equiv C - C_4H_9$	$(7,0 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(5,5 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(5,6 \pm 0,1) \cdot 10^6$
IV	$(C_2H_5O)_2P(O)SC_6H_{13}$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^3$

щего действия на холинэстеразы, и три субстрата: АТХ, с наибольшей скоростью гидролизующийся под действием АХЭ, ПрТХ и БуТХ, являющийся специфическим субстратом бутирилхолинэстеразы (БХЭ). Как видно из табл. 1, величины K_{II} для каждого из ФОИ практически

не зависели от природы субстрата. Следовательно, можно заключить, что холинэстеразная активность нервной ткани командорского кальмара обусловлена одним ферментом, т. к. невозможно, чтобы два фермента обладали одинаковой субстратной специфичностью и чувствительностью к столь различным по структуре ФОИ. Исследователи свойств ХЭ зрительных ганглиев тихоокеанского кальмара также пришли к выводу об однородности ферментативной активности у этого вида [3].

Субстратная специфичность. В табл. 2 представлены кинетические параметры гидролиза тioxолиновых эфиров по действию ХЭ коман-

Таблица 2

Субстратная специфичность холинэстераз командорского и тихоокеанского кальмаров

Кальмары	Субстраты	П а р а м е т р ы		
		$V_{\max}$, $M \cdot c^{-1} \cdot M^{-1}$	$V_{отн}$, %	K_m , M
Командорский	Ацетилтихолин	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$	100	$(3,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$
	Пропионилтихолин	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$	100	$(2,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$
	Бутирилтихолин	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$	75	$(1,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$
Тихоокеанский	Ацетилтихолин	$2,2 \cdot 10^{-8}$	100	$6,6 \cdot 10^{-5}$
	Пропионилтихолин	$2,1 \cdot 10^{-8}$	95	$6,4 \cdot 10^{-5}$
	Бутирилтихолин	$1,1 \cdot 10^{-8}$	50	$8,2 \cdot 10^{-5}$

дорского и тихоокеанского [9] кальмаров. В случае обоих ХЭ скорость гидролиза АТХ и ПрТХ была одинаковой, а гидролиз БуТХ под действием ХЭ тихоокеанского кальмара протекал с меньшей скоростью. В этом проявилось своеобразие свойств ХЭ обоих кальмаров по сравнению с типичной АХЭ ($V_{АТХ} > V_{ПрТХ}$; $V_{БуТХ} = 0$) и БХЭ ($V_{БуТХ} > V_{ПрТХ} > V_{АТХ}$) [10]. Величины K_m у ХЭ командорского кальмара оказались несколько выше, чем у ХЭ тихоокеанского кальмара.

Сравнительное исследование антихолинэстеразной эффективности ФОИ различной структуры. В табл. 3 сопоставлена чувствительность к группе ФОИ у ХЭ двух видов кальмаров и двух «реперных» ХЭ — АХЭ эритроцитов человека и БХЭ сыворотки крови лошади. Дипизопропифторфосфат (соединение I), будучи специфическим ингибитором БХЭ, оказался практически столь же эффективным ингибитором ХЭ обоих видов кальмаров. Сульфониевый ФОИ (соединение II), специфический ингибитор АХЭ, несколько сильнее тормозил ХЭ тихоокеанского кальмара, чем командорского, причем по своей чувствительности ХЭ кальмаров занимали промежуточное положение между АХЭ и БХЭ. Сульфидный аналог (соединение V) оказался в 110—160 раз слабее сульфониевого (соединение II). Это различие в случае АХЭ и БХЭ составляет, соответственно, 3300 и 700 раз и объясняется не только большей подвижностью сложноэфирной связи у соединения II (константы щелочного гидролиза у соединения V ниже, чем у соедине-

ния II более, чем на 2 порядка [8]), что повышает фосфорилирующую способность ФОИ, но и взаимодействием сульфоневой группировки с анионным участком каталитического центра ХЭ. Соединения V ингибировало ХЭ кальмаров в 5—50 раз сильнее, чем «реперные» АХЭ и БХЭ. Ранее отмечалась необычно высокая чувствительность ХЭ тихоокеанского кальмара к ФОИ с 3,3-диметилбутильным радикалом в отщепляемой части (соединения VI и VIII) [11]. По отношению к ХЭ

Таблица 3

Антихолинэстеразная эффективность некоторых фосфорорганических ингибиторов (k_{II} , $M^{-1} \text{ мин}^{-1}$; 25°; pH 7,5; субстрат—ацетилтихолинбромид)

N соединения	Ингибитор	Источники холинэстеразы			
		зрительные ганглии кальмаров		сыворотка крови лошади	эритроциты человека
		командорский	тихоокеанский	бутирилхолинэстераза	АХЭ
I	$((CH_3)_2CHO)_2P(O)F$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$6,9 \cdot 10^6$ [12]	$1,5 \cdot 10^7$ [13]	$9,5 \cdot 10^4$ [13]
II	$C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_2H_4SCH_3C_2H_5$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^7$ [12]	$3,7 \cdot 10^6$ [8]	$1,3 \cdot 10^8$ [8]
V	$C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_2H_4SC_2H_5$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$ [3]	$5,2 \cdot 10^3$ [3]	$4,0 \cdot 10^4$ [3]
VI	$C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_2H_4C(CH_3)_3$	$(6,3 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^6$ [11]	$4,7 \cdot 10^3$ [3]	$1,6 \cdot 10^3$ [11]
	$C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_6H_{13}$	$(7,0 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^5$ [11]	$3,8 \cdot 10^4$ [3]	$1,6 \cdot 10^4$ [3]
VIII	$(C_2H_5O)_2P(O)SC_2H_4C(CH_3)_3$	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^5$ [3]	$3,5 \cdot 10^3$ [14]	$8,0 \cdot 10^2$ [14]
IV	$(C_2H_5O)_2P(O)SC_6H_{13}$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$8,4 \cdot 10^3$ [3]	$3,3 \cdot 10^4$ [5]	$3,8 \cdot 10^3$ [5]

командорского кальмара эффективность этих ФОИ была в 4—9 раз ниже, однако она оставалась более высокой по сравнению с «реперными» ХЭ. Еще одно различие между ХЭ командорского и тихоокеанского кальмаров выявилось при сравнении ингибирующего действия соединения VI и его изомера нормального строения соединения VII: в первом случае снижение было 90-кратным, а во втором—10-кратным. У производных диэтокситрифосфорной кислоты (соединения VIII и IV) столь существенных различий между ХЭ кальмаров не наблюдалось. В целом чувствительность к гидрофобным ФОИ (соединения IV—VIII) у ХЭ командорского кальмара была ниже, чем у ХЭ тихоокеанского кальмара.

Изучение ацетиленовых ФОИ и их аналогов. В табл. 4 представлены данные исследования чувствительности ХЭ командорского кальмара к группе ацетиленовых и соответствующих им насыщенных ФОИ. Эти соединения, весьма сильные ингибиторы различных ХЭ [5], срав-

ниваются между собой по величине «ацетиленового эффекта» — отношению величин k_{II} ацетиленового ФОИ и его насыщенного аналога. В первой подгруппе изученных ФОИ (соединения IX—XIV) прослеживается влияние на антиферментное действие эффекта «отодвигания» ацетиленовой группировки от сложнэфирной связи. Во-первых, сама величина «ацетиленового эффекта» у ХЭ кальмара значительно ниже, чем у АХЭ и БХЭ: так, в случае соединения IX и X «эффект» был ниже соответственно в 340 и 900 раз. Во-вторых, введение ацетиленовой группировки в γ -положение (соединения XIII и XIV) приводит к тому, что в случае ХЭ кальмара насыщенное соединение (XIV) эффективнее ацетиленового ФОИ (соединения XIII), в то время как

Таблица 4

Антихолинэстеразная эффективность ацетиленовых ФОИ и их насыщенных аналогов общей формулы $(C_2H_5O)_2P(0)S-R$
(k_{II} , $M^{-1} \text{ мин}^{-1}$; 25°; pH 7,5; субстрат—ацетилтихолинбромид)

N соединения	R	ХЭ командорско-го кальмара	АХЭ [5]	Бтирилохлин-эстераза [5]
IX	$-C\equiv CH$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^1$	$5,6 \cdot 10^7$
X	$-C_2H_5$	$(6,7 \pm 0,4) \cdot 10^2$ (240)	$2,7 \cdot 10^3$ (82000)	$2,7 \cdot 10^2$ (210000)
XI	$-CH_2-C\equiv CH$	$(2,5 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^5$
XII	$-C_3H_7$	$(3,3 \pm 0,2) \cdot 10^2$ (8)	$7,0 \cdot 10^1$ (3200)	$7,0 \cdot 10^2$ (570)
XIII	$-CH_2CH_2-C\equiv CH$	$(4,7 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^1$
XIV	$-C_4H_9$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^1$ (0,3)	$6,4 \cdot 10^2$ (6)	$4,9 \cdot 10^3$ (5)
III	$-C\equiv C-C_4H_9$	$(7,0 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^8$
IV	$-C_6H_{13}$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^3$ (4700)	$3,8 \cdot 10^3$ (2500)	$3,3 \cdot 10^1$ (3000)
XV	$-CH_2-C\equiv C-C_3H_7$	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^5$ (120)	$1,4 \cdot 10^1$ (1)	$1,0 \cdot 10^6$ (30)
XVI	$-CH_2CH_2-C\equiv C-C_2H_5$	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^1$ (7)	$4,0 \cdot 10^3$ (1)	$1,2 \cdot 10^5$ (4)

Примечание. В скобках указана величина «ацетиленового эффекта».

у «реперных» ХЭ «ацетиленовый эффект» хотя и незначительный, но сохраняется. В другой подгруппе (соединения III, IV, XV, XVI), где представлены ФОИ с разным положением ацетиленовой группировки при общей длине алкила C_6 , «ацетиленовый эффект» в случае ХЭ кальмара оказался даже несколько выше, чем у «реперных» ХЭ. Сравнение трех пар соединений—III и IX, XV и XI, XVI и XIII—позволяет проанализировать влияние на антиферментное действие наличия алкильного радикала рядом с ацетиленовой группировкой. Когда ацетиленовая группировка находится в α - (соединения III и IX) и β -положении (соединения XV и XI), наличие алкильного радикала существенно повышает эффективность по отношению к ХЭ кальмара (в 45—70 раз) и очень незначительно—к БХЭ. В случае АХЭ незамещенные ацетиленовые ФОИ (соединения IX, XI) были эффективнее своих алкилсодержащих гомологов (соединения III, XV). Несхожими оказались зависимости эффективности ФОИ от длины алкильного ради-

кала (соединения X, XII, XIV, IV): в случае ХЭ кальмара более активным был бутильный гомолог (соединения XIV), а в случае «реперных» ХЭ—гексилный (соединение IV). Высокая эффективность ФОИ с тнобутильной группировкой отмечалась ранее по отношению к ХЭ тихоокеанского кальмара [11].

Исследование субстратной и ингибиторной специфичности ХЭ зрительных ганглиев командорского кальмара выявило определенные отличия от свойств ХЭ тихоокеанского кальмара, что подтверждает представления о видоспецифичности ХЭ кальмаров.

Изучение взаимодействия с группой ацетиленовых ФОИ и их аналогов выявило своеобразие свойств, а значит и особенностей структуры каталитического центра ХЭ нервной ткани командорского кальмара.

SUBSTRATE SPECIFICITY AND SUSCEPTIBILITY TO INHIBITORS OF KOMANDOR'S SQUID NERVE TISSUE CHOLINESTERASE

BRESTKIN A. P., KOVALJEV N. N., ROZENGART E. V., KHOVANSKIKH A. E.,
FEDORETZ U. A., EPSTEIN L. M.

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Academy of Sciences of USSR, Leningrad

For the first time the substrate specificity and susceptibility to inhibitors of cholinesterase (ChE) from optic ganglions of *Komandor* squid, *Berrytheutis* magister, have been studied. It has been shown the cholinesterase activity was due to a single enzyme. It was noted that Komandor squid ChE differs from that of Pacific squid (*Todarodes pacificus*). This points to the species specificity of cholinesterase in different kinds of squids. The action of organophosphorus inhibitors, containing acetylene group, on Komandor squid's cholinesterase was also studied for the first time and structure-dependent effect of inhibitors has been demonstrated.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шевцова С. П., Бресткин А. П., Несис К. Н., Розенгарт Е. В. Океанология, т. 17, с. 1109—1113, 1977.
2. Шевцова С. П., Бресткин А. П., Несис К. Н., Розенгарт Е. В. Океанология, т. 19, с. 481—486, 1979.
3. Turpaev T. M., Abashkina L. I., Brestkin A. P., Brich I. L., Grigorjeva I. M., Pevzner D. L., Rozengart V. J., Rozengart E. V., Sakharov D. A. Eur. J. Biochem., v. 6, p. 55—59, 1968.
4. Ellmann G. N., Courtney R. D., Feather K. M. Biochem. Pharm., v. 7, p. 88—95, 1961.
5. Балашова Е. К., Бресткин А. П., Жуковский Ю. Г., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е., Вихрева Л. А., Годовиков Н. Н., Бабашева К. К., Кабачник М. И. Докл. АН СССР, т. 272, с. 503—506, 1983.
6. Григорьева Г. М.—В кн.: Сравнительная нейрофизиология и нейрохимия (под ред. Е. М. Крепса), Л., Наука, с. 3—12, 1976.
7. Григорьева Г. М., Конычева Н. В.—В кн.: Физиология и биохимия морских и пресноводных животных (под ред. Е. М. Крепса), с. 194—204, Л., Наука, 1979.

8. Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахобов А. А., Асланов Х. А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Ташкент, Фан, 1976.
9. Виняр Т. Н. Взаимодействие аммониевых соединений с холинэстеразой и холинорецептором одного и того же животного, канд. дис., Л., 1985.
10. Бресткин А. П., Кабачник М. И., Розенгарт Е. В. Докл. АН СССР, с. 274, с. 960—965, 1984.
11. Розенгарт Е. В. Реакционная способность органических соединений, т. 4, с. 954—962, Тарту, 1967.
12. Шевцова С. П. Субстратно-ингибиторный анализ холинэстеразы ткани оптических ганглиев кальмаров и биохимический признак вида, канд. дис., Киев, 1983.
13. Яковлев В. А. Кишечка ферментативного катализа, М., Наука, 1965.
14. Шмелева В. Г. Исследование антихолинэстеразного действия некоторых фосфорорганических соединений, канд. дис., Л., 1967.

Поступила 15. II 1986

УДК 577.150.7—158.4:611.81

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОЧИЩЕННОЙ И МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА

ХВАТОВА Е. М., ГАРСИЯ А.

Горьковский медицинский институт им. С. М. Кирова

Разработан метод выделения митохондриальной малатдегидрогеназы (мМДГ) мозга, основанный на ИОХ на катионите «Биокарб». Изучены кинетические свойства очищенной мМДГ мозга, солюбилизированной мМДГ и фермента митохондриальной фракции мозга. Показано, что для мМДГ мозга характерны существенные различия в кинетических характеристиках прямой и обратной реакции. Установлено, что для очищенной мМДГ характерна гиперболическая зависимость начальной скорости реакции от концентрации малата и NADH. В то же время для фермента, солюбилизованного с митохондриальными мембранами, но не очищенного от других растворимых митохондриальных белков, выявлена возможность наряду с классической кинетикой Михаэлиса-Ментен проявлять положительную кооперативность по NADH. Для мМДГ митохондриальной фракции мозга характерна четко выраженная положительная кооперативность, проявляющаяся S-образной кривой насыщения фермента NADH, нелинейностью графиков в координатах Лайнуивера-Бэрка и Эди-Хофсти, а также в значениях коэффициентов pH и q .

Малатдегидрогеназа (L-малат: NAD оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.37) представлена в клетках эукариот двумя генетически детерминированными формами—цитоплазматической и митохондриальной. К настоящему времени наиболее изучена мМДГ из сердца и печени. Исследованы их физико-химические свойства, установлены основные кинетические характеристики, определен механизм каталитического