8. *Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахабов 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. *Брестким 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.* Кинетика 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, солюбилизированного с митохондриальных мембран, но не очищенного от других растворимых митохондриальных белков, выявлена возможность наряду с классической кинетикой Михаэлиса-Ментен проявлять положительную кооперативность по NADH. Для МДГ 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 n_H 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

действия. В то же время мМДГ мозга остается мало изученной, хотя участвует в наиболее активном для нервной ткани малат-аспартатном пути переноса восстановительных эквивалентов [1, 2].

Имеющиеся в литературе единичные работы по мМДГ мозга [3, 4] не дают полного представления о свойствах этого ключевого для метаболизма мозга фермента. Вместе с тем, даже эти скудные данные указывают на то, что мозговая мМДГ не идентична по своим свойствам ферменту из других тканей. Имеющиеся методики выделения фермента из ткани мозга сложны и трудоемки.

Данные литературы свидетельствуют о существенном влиянии на свойства ферментов взаимодействия с митохондриальными мембранами. Для мМДГ такие исследования проводились только на ткани печени [5—7].

Цель настоящего исследования—разработка простого и доступного метода получения очищенной мМДГ мозга и изучение кинетических характеристик мМДГ мозга в зависимости от взаимодействия с митохондриальными мембранами.

Материалы и методы

Активность малатдегидрогеназы определяли общепринятым спектрофотометрическим методом по изменению концентрации NADH. Прямую малатдегидрогеназную реакцию (Малат+NAD→Оксалоацетат + NADH) исследовали в системе, предложенной Aspray и соавт. [8] в нашей модификации (не используется семикарбазид). Концентрация малата составляла от 0,275 до 17,6 мМ. Обратную реакцию (Оксалоацетат + NADH → Малат + NAD) изучали по методу Forster, Harrison [9]. Концентрация NADH варьировала от 0,0125 до 0,4 мМ. Реакцию начинали внесением фермента в реакционную среду.

Значения начальных скоростей рассчитывали математическим методом, описанным Atkins, Nimmo [10]. K_m и V реакции определяли по формулам, представленным Корнин-Боуденом [11], величину n_H рассчитывали графически, коэффициент q—по Курганову [12]. Зависимость начальной реакции от концентрации субстратов выражали в прямых величинах и в координатах Эди-Хофсти и Лайнуивера-Берка. Концентрацию белка определяли по Lowry и соавт. [13] или спектрофотометрически [14]. Гомогенность препарата мМДГ проверяли электрофорезом в ПААГ по Маурер у [15], величину M_r субъединиц мМДГ определяли электрофоретически [16]. Препарат очищенной мМДГ мозга получали методом, разработанным в нашей лаборатории из митохондриальной фракции головного мозга крупного рогатого скота. Центрифугирование на центрифуге «Beckman L-5 65B» и все остальные этапы очистки проводили при 0—4°.

Ткань мозга промывали 0,15 М раствором KCl и готовили 10%-ный гомогенат на 0,25 М сахарозе (pH 7,4), который центрифугировали последовательно при 1500 и 5000g для осаждения неразрушенных клеток, ядер и клеточных мембран. Митохондриальную фракцию получали центрифугированием супернатанта в течение 10 мин при 12500g и далее очищали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (наслоение 0,7:1,2:1,4 М растворов сахарозы в соотношении 1:1:1, pH 7,4) в течение 2 ч при 50000g [17]. По данным электронной микроскопии, на этом этапе происходит очистка митохондриальной фракции от загрязняющих ее синаптосом и миелина. Очищенную фракцию митохондрий суспендировали в 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,4) и осаждали при 12500g. Осадок вновь суспендировали в том же буфере и разрушали митохондрии в гомогенизаторе типа «Блендор» в течение 5 мин при ско-

рости 13000 оборотов в мин. От митохондриальных мембран освобождались центрифугированием при 130000g. Полученный супернатант служил источником мМДГ мозга для дальнейшей очистки; он же был объектом исследования свойств солюбилизированной мМДГ мозга.

Дальнейшую очистку препарата мМДГ проводили с применением кислотной преципитации части балластных белков при pH 6,0 и ИОХ на отечественном катионите «Биокарб». Сорбцию мМДГ осуществляли в колонке с 3,2—4,2 см³ катионита со скоростью 85—90 мл/ч. По окончании сорбции колонку промывали деионизированной водой до исчезновения в промывных водах белка.

Десорбцию фермента проводили в ступенчатом градиенте pH тремя 0,1 М фосфатными буферными растворами с pH 6,0; 6,5 и 7,0. Скорость десорбции составляла 40—45 мл/ч. На выходе из колонки отбирали фракции элюата, в которых определяли малатдегидрогеназную активность. Фракции с величиной У.А. более 1000 мкмоль NADH/мг белка/мин объединяли в общий объем, в дальнейшем этот препарат использовали для исследования свойств очищенной мМДГ мозга

Результаты и обсуждение

Разработанные условия выделения и очистки мМДГ мозга позволили получить препарат со степенью очистки фермента 200—250 раз. Величина У. А. составила 1800—2500 мкмоль NADH/мг белка/мин. В препарате в качестве примеси присутствовал еще один белок, идентифицировать который не удалось.

Электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-Na показал, что для субъединицы мМДГ мозга характерна величина M_r 35 кД, что близко M_r субъединицы мМДГ сердца [18].

Изучена зависимость скорости реакции восстановления оксалоацетата от pH среды (рис. 1). Показано, что кривая зависимости имеет типичную колоколообразную форму с максимумом активности при pH 7,6. Эти данные близки результатам, полученным Bracht, Campello [19] на мМДГ сердца. Особенностью мМДГ мозга является более щелочной оптимум и широкий диапазон pH.

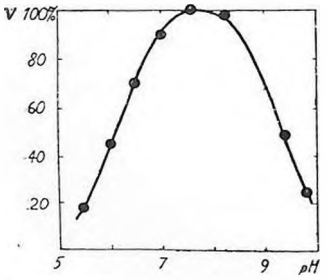

Рис. 1.

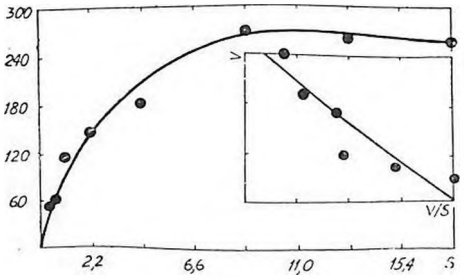

Рис. 2.

Рис. 1. Зависимость активности мМДГ мозга в реакции восстановления от pH среды. По оси ординат—активность фермента в % от максимально регистрируемой

Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции (V, нМ/мин) от концентрации малата (мМ) для очищенной мМДГ мозга

Установлены существенные различия в кинетических характеристиках очищенной мМДГ мозга для малата и NADH (таблица). Более низкое значение K_m для NADH по сравнению с K_m для малата свидетельствует в пользу бо́льшего сродства фермента к восстановленному коферменту, чем к восстановленному субстрату реакции. Существенно выше и V окисления NADH.

Кривая зависимости начальной скорости реакции от концентрации малата имеет гиперболическую форму (рис. 2). Активность фермента достигает максимально регистрируемой скорости при концентрации малата 8,8 мМ. Дальнейшее увеличение его концентрации не ведет к существенному изменению скорости реакции. В координатах Эди-Хофсти и Лайнуивера-Бэрка графики имеют линейную форму, что подтверждает классический характер кинетики фермента. Кривая насыщения NADH для очищенной мМДГ мозга имеет гиперболическую форму (рис. 3, *а*). Насыщение фермента достигается при концентрации восстановленного кофермента 0,2 мМ, дальнейшее увеличение ее не ведет к изменению скорости реакции. В координатах Лайнуивера-Бэрка и Эди-Хофсти графики линейны.

Таблица

Кинетические характеристики мМДГ мозга

		Очищенная мМДГ	Солюбилизированная мМДГ	МДГ митохондриальной фракции
Малат	K_m (мМ)	0,9	————	1,9
	V (мкмоль/мг белка/мин)	$1,69 \cdot 10^2$	————	0,39
NADH	K_m (мМ)	0,034	0,044	0,057
	V (мкмоль/мг белка/мин)	$2,03 \cdot 10^3$	25,4	3,54

Изучены кинетические характеристики МДГ мозга митохондриальной фракции. Значения K_m и V для малата и NADH представлены в таблице. Как и в случае очищенного фермента, для МДГ митохондриальной фракции установлено более высокое сродство к NADH, чем к малату, и высокая скорость окисления NADH. Вместе с тем, форма кривой насыщения фермента восстановленным коферментом существенно отличается от аналогичной кривой для очищенной мМДГ (рис. 3, *б*). Сигмоидный характер кривой насыщения свидетельствует о неподчинении фермента классической кинетике Михаэлиса-Ментен и может оцениваться как проявление аллостерических свойств. В митохондриальной фракции обнаружено изменение по сравнению с очищенной мМДГ чувствительности фермента к высоким концентрациям NADH. При увеличении концентрации NADH свыше 0,2 мМ наблюдается от-

четливое ингибирование активности фермента. В координатах Лайнуивера-Бэрка и Эди-Хофсти графики не линейны, что свидетельствует о проявлении мМДГ митохондриальной фракции мозга выраженной положительной кооперативности по NADH. Это подтверждается высокими значениями величин n_H и q, равных соответственно 1,6 и 1,68.

Митохондриальная МДГ мозга, солюбилизированная с мембран, но не очищенная от других растворимых митохондриальных белков, проявляет кинетические свойства, близкие, но не идентичные очищенному ферменту (таблица). Солюбилизированная мМДГ характеризует-

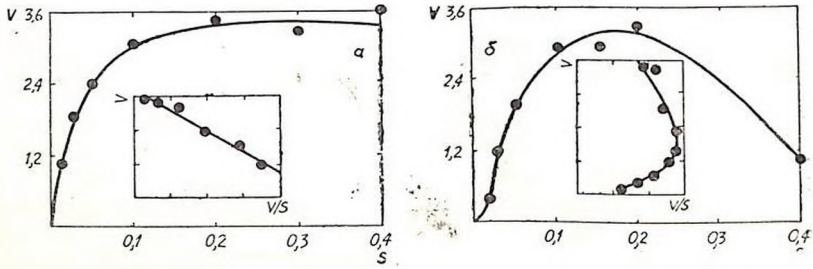

Рис. 3. Зависимость начальной скорости реакции (V, нМ/мин) от концентрации NADH (S, мМ): *а*—для очищенной мМДГ, *б*—для мМДГ митохондриальной фракции мозга

ся гиперболической кривой насыщения NADH (рис. 4), позволяющей предполагать подчинение фермента уравнению Михаэлиса-Ментен. Однако это предположение подтверждается не во всех опытах. При анализе отдельных экспериментов отмечена как линейная форма графиков в координатах Эди-Хофсти и значение n_H и q около 1, так и существенное отклонение от линейности графика Эди-Хофсти (рис. 4) и

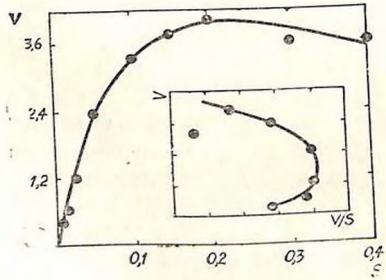

Рис. 4. Зависимость начальной скорости реакции (V, нМ/мин от концентрации NADH (S, мМ) для мМДГ, солюбилизированной с митохондриальных мембран (график в координатах Эди-Хофсти представляет пример из группы опытов с неклассической кинетикой)

увеличение коэффициента q до 1,5. Последнее можно расценивать как проявление положительной кооперативности для NADH. Одной из причин такого рода отклонений от кинетики Михаэлиса-Ментен может явиться присутствие в растворе, по крайней мере, двух форм фермента с различающимися кинетическими характеристиками (одна из которых может обладать аллостерическими свойствами). Однако для

конкретного выяснения причин такой неоднородности в свойствах солюбилизированной мМДГ мозга требуются дальнейшие эксперименты.

В работе установлено, что для очищенной мМДГ мозга характерно более высокое сродство к NADH, чем к малату, что соответствует данным, касающимся мМДГ из других тканей [19, 20]. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации малата и NADH имеет гиперболическую форму, что указывает на классический характер кинетики фермента. Такого рода зависимость установлена для очищенной мМДГ сердца [21, 22]. Вместе с тем, в наших исследованиях выявлена более низкая чувствительность мМДГ мозга к изменению концентрации NADH, что позволяет сделать вывод о близких, но не идентичных свойствах мМДГ мозга и других тканей.

Показано, что мМДГ мозга, солюбилизированная с митохондриальных мембран, но не очищенная от других митохондриальных белков, по ряду кинетических свойств близка очищенной мМДГ мозга. Для обеих форм мМДГ мозга свойственна низкая чувствительность к высоким концентрациям NADH, гиперболическая форма кривых насыщения восстановленным коферментом и близкие значения K_m для NADH. Однако для солюбилизированного фермента график в координатах Эди-Хофсти может быть нелинейным. По мнению Диксона и Уэбба [23], при построении графика в этих координатах наиболее отчетливо проявляются отклонения фермента от кинетики Михаэлиса-Ментен. Характер отклонения от линейности и значение коэффициента q свидетельствуют о проявлении положительной кооперативности к NADH. На принципиальную возможность проявления мМДГ мозга аллостерических свойств указывают данные Kashiwamata и соавт. [3], установивших, что при взаимодействии очищенной мМДГ мозга с билирубином форма кривой насыщения фермента NADH меняется с гиперболической на S-образную.

Выявлены различия в кинетических свойствах очищенной мМДГ мозга и фермента митохондриальной фракции мозга. Для фермента, связанного с митохондриальными мембранами, установлено выраженное проявление аллостерических свойств, что выражается в значениях n_H и q, форме графиков в координатах Лайнуивера-Бэрка и Эди-Хофсти и форме кривой насыщения фермента NADH. Полученные данные позволяют предполагать, что мМДГ мозга, сохраняя связь с митохондриальными мембранами, проявляет положительную кооперативность к NADH, которую утрачивает при солюбилизации с мембраны. На примере ткани печени показано, что мМДГ, связанные с мембраной и солюбилизированные с нее, отличаются друг от друга по физико-химическим и кинетическим свойствам [5—7].

Представленные результаты указывают на возможность регуляции мМДГ мозга путем взаимодействия фермента с митохондриальными мембранами и, вероятно, с другими растворимыми митохондриальными белками. Можно полагать, что существование подобного меха-

низма *in vivo* значительно расширяет каталитические возможности фермента, регулируя его активность в широком диапазоне концентраций восстановленного кофермента.

THE KINETIC CHARACTERISTICS OF MEMBRANE-BOUND AND PURIFIED BRAIN MITOCHONDRIAL MALATE DEHYDROGENASE

KHVATOVA E. M., GARCIA A.

S. M. Kirov Medical School, Gorky

A new method for the purification of brain mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH), using ion-exchange chromatography on „Biocarb", has been developed. Kinetic properties of brain mitochondrial fraction MDH, purified brain mMDH and mMDH solubilized from mitochondrial membranes have been studied. Significant differences in the forward and backward reaction kinetic properties have been detected for brain mMDH. The classic kinetics of purified brain mMDH for malate and NADH has been established. As for the enzyme solubilized from mitochondrial membranes but not separated from another soluble mitochondrial proteins there has been established a possibility to manifest positive cooperativity for NADH along with the classic kinetics. Brain mitochondrial fraction MDH is characterized by a pronounced positive cooperativity for NADH.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Dawson A. G.* Trends in Biochem. Scient., v. 4, № 8, p. 171—176, 1979.
2. *Строев Е. А.*—В кн.: Дегидрогеназы в норме и патологии (под ред. Е. М. Хватовой), с. 28—36, Горький, Волго-Вятское Изд-во, 1980.
3. *Kashiwamata S., Niwa F., Katoh R.* J. Neurochem., v. 84, p, 189—191, 1975.
4. *Lai J. C. K., Clark J. B.* Biochem. Soc. Trans., v. 6, p. 993—995, 1976.
5. *Comte J., Gantheron D.* Biochimie, v. 60, p. 1299—1305, 1978.
6. *Casado F., Cortes A., Bozal J.* Int. J. Biochem., v. 11, p. 437—447, 1980.
7. *Kircova M., Russanov E.* Acta Physiol. Pharmacol. Bulg., v. 5, № 4, p. 57—62, 1979.
8. *Aspray T. E., Rihimaki G. M., Wolfe R. G.* J. Biol. Chem., v. 254, p. 1576—1579, 1979.
9. *Foster M., Harrison J. H.* Biochem. and Biophys. Res. Communs., v. 64, p. 528—534, 1975.
10. *Atkins G. L., Nimmo I. A.* Anal. Biochem., v. 104, p. 1—9, 1980.
11. *Корниш-Боуден Э.* Основы ферментативной кинетики, М., Мир ,1979.
12. *Курганов Б. И.* Аллостерические ферменты, М., Наука, 1978.
13. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v, 193, p. 265—275, 1951.

14. *Кочетков Г. А.* Практическое руководство по энзимологии, М., Высшая школа, 1980.
15. *Маурер Г. Р.* Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле, М., Мир, 1971.
16. *Weber K., Osborn M.* J. Biol. Chem., v. 244, p. 4406—4412, 1969.
17. *Fonyo A., Somogyi J.* Acta physicl. Acad. sci. hung., v. 18, № 3, p. 191—198, 1960.
18. *Banaszak L. J., Bradshaw R. A.*—In: The Enzumes (ed. P. D. Boyer). N.-Y., v. XI, part A, p. 369—396, 1975.
19. *Bracht A., Campello A. P.* Experientia, v. 35, p. 1559—1561, 1979.
20. *Thorne C. J. R., Kaplan N. O.* J. Biol. Chem., v. 238, p. 1861—1868, 1963.
21. *Bracht A., Campello A. P.* Arg. Biol. Technol., v. 23, p. 337—341, 1980.
22 *Kitto G. B., Kaplan N. O* Biochemistry, v. 5, p. 3966—3980, 1966.
23. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты, т. 1, М., Мир, 1982.

Поступила 14. V 1986

УДК 546.001.1:547.963:616.8.009

НАРУШЕНИЯ КАТАБОЛИЗМА БИОГЕННЫХ АМИНОВ И ДРУГИХ АЗОТИСТЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

ХУЖАМБЕРДИЕВ М., САИДУЛЛАЕВ Т., МАМАДИЕВ М., *ГОРКИН В. З.

Андижанский государственный медицинский институт им. М. И. Калинина
*Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

В динамике развития экспериментального атеросклероза на фоне выраженных нарушений содержания в крови холестерина, триглицеридов и β-липопротеидов обнаружено снижение дезаминирования моноаминов—серотонина, бензиламина и тирамина—при одновременном усилении дезаминирования АМР и появлении качественно новой кадаверидезаминазной активности в митохондриальной фракции ткани головного мозга кроликов. Полученные результаты указывают на возможность качественного обратимого модифицирования свойств митохондриальных МАО. При способствующем развитию атеросклероза гипотиреозе, но не при гипертиреозе, такие нарушения катаболизма азотистых соединений были выражены в еще большей мере, что согласуется с предположением о возможном патогенетическом значении качественного модифицирования активности МАО при атеросклерозе.

Нарушения метаболизма биогенных аминов в головном мозгу при атеросклерозе давно привлекают внимание исследователей [1] вследствие того, что амины и ферменты, участвующие в их метаболизме, имеют первостепенное значение для регуляции жизнедеятельности мозга [2], а также в связи с важностью для медицины нарушений его функций при атеросклерозе [3].

Целью настоящей работы было изучение в ткани головного мозга в динамике развития экспериментального атеросклероза особенностей нарушения ферментативного дезаминирования биогенных аминов и других азотистых соединений как ключевой реакции их катаболизма [4].