НЕЙРОХИМИЯ

т. 7, №. 4, 1988

УДК 577.153.661.717

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ МОЗГА КАПУСТНОЙ МУХИ *DELIA BRASSICAE* С КАТИОННЫМИ ЛИГАНДАМИ

КРАСНОВА Т. И., ГРИГОРЬЕВА Г. М., ХОВАНСКИХ А. Е., *ЛЕЖНЕВА И. П.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР
*ВНИИ защиты растений ВАСХНИЛ, Ленинград

Изучали взаимодействие холинэстеразы (ХЭ) мозга весенней капустной мухи *Delia brassicae*, АХЭ (ацетилхолинацетилгидролаза, КФ 3.1.1.7) из эритроцитов крови быка и бутирилхолинэстеразы (ацилхолин-ацилгидролаза, КФ 3.1.1.8, БуХЭ) из сыворотки крови лошади с ионами тетраалкиламмония (ТАА), имеющими различную длину алкильного радикала, и производными пиридиния—N-метилпиперидинием и 1,2,4-триметилпиридинием. Действие этих ионов оценивали величинами ингибиторных констант (K_i). Все использованные лиганды были обратимыми ингибиторами исследованных ХЭ по механизму действия, главным образом смешанного типа, и в отдельных случаях чисто конкурентного типа. Сравнительный анализ величин K_i для разных ХЭ показал, что ХЭ мух и АХЭ близки по силе действия на них ионов ТАА, а по механизму взаимодействия с этими ионами ХЭ мух более сходна с БуХЭ. Для производных пиридиния по механизму действия также наблюдается большее сходство между ХЭ мух и БуХЭ. Для ХЭ мух установлено наибольшее возрастание ингибиторного действия с увеличением длины алкильного радикала ТАА от CH_3 до C_4H_9—в 120 раз, тогда как для АХЭ и БуХЭ—только в 36 и 26 раз соответственно. Сравнение величин K_i для взаимодействия растворимой и мембранной ХЭ мозга капустных мух с ионами ТАА выявило большую чувствительность (в 2 раза) мембранной формы фермента к этим ионам.

Как известно, активный центр АХЭ (КФ 3.1.1.7) и БуХЭ (КФ 3.1.1.8) состоит из двух участков—эстеразного и анионного. Последний осуществляет связывание молекул катионных лигандов, субстратов и ингибиторов, за счет ион-ионного взаимодействия с катионной группой [1]. Связывание катионных лигандов осуществляется также анионными группами вне активного центра, составляющими регуляторный центр ХЭ [2, 3]. В непосредственной близости от эстеразного и анионного участков расположены гидрофобные области, способствующие сорбции молекул субстратов и ингибиторов путем гидрофобных взаимодействий и в значительной степени определяющие специфичность ХЭ [4, 5].

В НС позвоночных животных присутствует, как правило, АХЭ, в то время как у беспозвоночных обнаружены ХЭ с иной субстратной специфичностью [6], что может быть связано с различием в структуре отдель-

ных участков активного центра ХЭ. Так, установлено, что ХЭ мозга насекомых Insecta, комнатных мух Musca domestica (отряд Diptera) обладает более обширными гидрофобными областями вблизи анионного участка и, возможно, большим расстоянием между анионным и эстеразным участками активного центра, чем АХЭ млекопитающих [7, 8].

Настоящая работа является продолжением исследования свойств ХЭ мозга весенней капустной мухи Delia brassicae, другого представителя отряда Diptera, являющегося вредителем сельскохозяйственных культур [9, 10]. Целью работы было изучение роли анионного участка и структуры его гидрофобных областей в активном центре ХЭ мозга капустной мухи с помощью различных катионных лигандов—ионов ТАА и производных пиридиния, сравнение полученных данных с действием этих соединений на ХЭ млекопитающих—АХЭ и БуХЭ для выявления особенностей фермента мозга капустных мух.

Материалы и методы

Источником растворимой и мембраносвязанной форм ХЭ служили головы весенней капустной мухи Delia brassicae. Использовали лабораторную культуру мух, выращенных на базе Всесоюзного научно-исследовательского института защиты растений. После препарирования готовили гомогенат голов (15 мг ткани/мл буфера) на 0.025 М фосфатном буфере, pH 7,5 и ультрацентрифугировали его на ультрацентрифуге УР-65 при 100 000 g в течение 1 ч при температуре 1—3°. Полученный супернатант использовали как растворимую форму ХЭ. Для выделения мембраносвязанной формы ХЭ из осадка готовили гомогенат и проводили его отмывание от растворимой ХЭ и обработку отмытого осадка 0,1%-ным Тритоном Х-100, как описано ранее [10]. Полученный после ультрацентрифугирования супернатант (100 000 g 1 ч) служил в качестве мембранной формы ХЭ.

Источниками АХЭ из эритроцитов крови быка и БуХЭ из сыворотки крови лошади являлись коммерческие препараты производства Пермского научно-исследовательского института вакцин и сывороток с величиной У. А. 0.8 и 13,6 Е/мг белка соответственно.

В качестве субстратов использовали коммерческие препараты иодидов ацетилтиохолина (АТХ, «Chemapol», ЧССР) и бутирилтиохолина (БуТХ, «Merck», ФРГ). Ингибиторами служили коммерческие препараты тетраметиламмонийиодида (ТМА, «Chemapol», ЧССР), тетраэтиламмонийиодида (ТЭА, «Chemapol», ЧССР) и тетрабутиламмоний—бромида (ТБА, «Chemapol», ЧССР), а также производные пиридиния-N-метилпиперидинийиодид (ІМ—2) и 1, 2, 4-триметилпиридинийиодид (ІМ—3), синтезированные Абдувахабовым А. А. (Институт биоорганической химии УзССР, Ташкент).

Активность ХЭ определяли спектрофотометрическим методом по Ellman и соавт. [11]. В качестве хромогена использовали 5,5′-дитиобис (2-нитробензойную) кислоту (ДТНБ, Koch-Light Laboratory, Англия).

Реакционная проба объемом 1 мл включала фермент, субстрат и 0.04 М фосфатный буфер, pH 7.5. Реакцию запускали добавлением субстрата после предварительной инкубации фермента в отсутствие и в присутствии ингибитора при 25°. После остановки реакции 1 мМ раствором Гд-42 (0.5 мл) добавляли 0.5 мл 2 мМ раствора ДТНБ и измеряли величину оптического поглощения при $\lambda = 412$ нм в односантиметровой кювете спектрофотометра СФ-46. По калибровочной кривой определяли количество подвергшегося гидролизу субстрата. Активность выражали в моль субстрата, подвергшегося гидролизу в 1 мин/мг белка.

Кинетические параметры для гидролиза субстрата—V и K_m рассчитывали по методу Лайнуивера-Берка [12]. Диапазон концентраций субстратов для ХЭ мух и АХЭ был $5 \cdot 10^{-5}$—$1 \cdot 10^{-3}$ М АТХ, для БуХЭ—$4 \cdot 10^{-4}$—$2 \cdot 10^{-3}$ М БуТХ. При исследовании взаимодействия ХЭ с ингибиторами измеряли скорости гидролиза субстратов в заданном диапазоне концентраций в отсутствие ингибитора и при 3—4 различных его концентрациях.

Величину K_i для диссоциации фермент-ингибиторного комплекса определяли по методу Диксона, Уэбба [12]. Идентификацию типа обратимого ингибирования проводили по графикам Лайнуивера-Берка для ферментативного гидролиза субстрата в присутствии и в отсутствие ингибитора [12]. В случае смешанного типа торможения конкурентную компоненту K_i' и бесконкурентную компоненту K_i'' рассчитывали методом Krupka [13] по формулам:

$$K'_i = \frac{[I]}{(tgz_2/tgz_1) - 1}, \qquad K''_i = \frac{[I]}{V_m/V_i - 1},$$

где $[I]$ — концентрация ингибитора, tgz_2, tgz_1 — угловые коэффициенты прямой зависимости $1/v$ от $1/S$, полученные в отсутствие, (tgz_1) и в присутствии (tgz_2) ингибитора, V_m и V_i — максимальные скорости гидролиза субстратов в отсутствие и при концентрации ингибитора $[I]$.

Вклад бесконкурентной составляющей оценивали с помощью коэффициента α, который рассчитывали по отношению K_i' и K_i''. Чем больше величина α, тем больше вклад бесконкурентной компоненты в ингибирование.

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [14].

Результаты и обсуждение

Результаты взаимодействия ионов ТАА с ХЭ мозга капустных мух представлены в табл. 1 и на рис. 1, 2. О силе действия этих обратимых ингибиторов судили по величине K_i. Величины ингибиторных констант для взаимодействия АХЭ и БуХЭ с ионами ТАА (табл. 2) незначительно отличаются от имеющихся в литературе, полученных при использовании других субстратов в сходных условиях среды (pH 7.5, 25°), а также при определении активности ферментов другими методами [15—17]. Значения K_i для взаимодействия ХЭ мух с ТМА и ТЭА оказались сходными с таковыми для АХЭ и примерно в 4 раза ниже по сравнению с K_i

Таблица 1

Кинетические параметры для взаимодействия растворимой ХЭ мозга капустных мух с ионами тетраалкиламмония (pH 7,5,25°; фосфатный буфер 0,04 М)

Ингибитор	Концентрация ингибитора, М	K_m, М·10^5	V_1, М·мин$^{-1}$·10^8·мг белка$^{-1}$	K_i, М	K_i', М	K_i'', М	α
ТМА	0	4,8	10,5				
	$4\cdot10^{-4}$	6,3	9,5				
	$1\cdot10^{-3}$	7,7	9,0	$(1,2\pm0,1)\cdot10^{-3}$	$(8,8\pm0,5)\cdot10^{-4}$	$(9,2\pm0,8)\cdot10^{-3}$	0,10
$(CH_3)_4\overset{+}{N}\cdot\overset{-}{I}$	$2\cdot10^{-3}$	9,0	8,3				
	$4\cdot10^{-3}$	11,0	8,0				
ТЭА	0	4,8	10,3				
	$2\cdot10^{-4}$	7,4	10,3	$(6,3\pm0,4)\cdot10^{-4}$	$(6,4\pm0,8)\cdot10^{-4}$		
	$4\cdot10^{-4}$	8,7	10,3				
$(C_2H_5)_4\overset{+}{N}\cdot\overset{-}{I}$	$2\cdot10^{-3}$	13,0	10,3				
ТБА	0	5,5	9,4				
	$2\cdot10^{-6}$	7,1	8,3	$(1,0\pm0,1)\cdot10^{-5}$	$(7,1\pm0,4)\cdot10^{-6}$	$(3,1\pm0,2)\cdot10^{-5}$	0,23
	$4\cdot10^{-6}$	8,0	7,8				
$(C_4H_9)_4\overset{+}{N}\cdot Br^-$	$1\cdot10^{-5}$	13,0	6,1				

Таблица 2

Кинетические параметры для взаимодействия АХЭ и БуХЭ с ионами тетраалкиламмония (pH 7,5; 25°; фосфатный буфер 0,04 М)

Фермент	Ингибитор	Концентрация ингибитора, М	K_m, М	V, М·мин$^{-1}$ мг белка$^{-1}$	K_I, М	K'_I, М	K''_I, М	α
АХЭ	ТМА	0	$0{,}9\cdot10^{-4}$	$2{,}4\cdot10^{-7}$	$(1{,}1\pm0{,}1)\cdot10^{-3}$	$(9{,}4\pm1{,}0)\cdot10^{-4}$	$(4{,}2\pm0{,}7)\cdot10^{-3}$	0,22
		$9{,}1\cdot10^{-4}$	$1{,}5\cdot10^{-4}$	$2{,}3\cdot10^{-7}$				
		$1{,}8\cdot10^{-3}$	$2{,}9\cdot10^{-4}$	$1{,}4\cdot10^{-7}$				
		$4{,}5\cdot10^{-3}$	$4{,}0\cdot10^{-4}$	$1{,}1\cdot10^{-7}$				
	ТЭА	0	$1{,}0\cdot10^{-4}$	$2{,}1\cdot10^{-7}$	$(6{,}7\pm0{,}6)\cdot10^{-4}$	$(3{,}1\pm0{,}2)\cdot10^{-4}$	$(1{,}4\pm0{,}1)\cdot10^{-3}$	0,22
		$3{,}0\cdot10^{-4}$	$1{,}4\cdot10^{-4}$	$1{,}6\cdot10^{-7}$				
		$9{,}1\cdot10^{-4}$	$2{,}0\cdot10^{-4}$	$1{,}3\cdot10^{-7}$				
		$1{,}8\cdot10^{-3}$	$2{,}9\cdot10^{-4}$	$1{,}0\cdot10^{-7}$				
	ТБА	0	$0{,}9\cdot10^{-4}$	$2{,}1\cdot10^{-7}$	$(3{,}7\pm0{,}4)\cdot10^{-3}$	$(2{,}6\pm0{,}2)\cdot10^{-3}$	$(9{,}7\pm0{,}4)\cdot10^{-3}$	0,27
		$1{,}0\cdot10^{-3}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	$1{,}8\cdot10^{-7}$				
		$2{,}0\cdot10^{-3}$	$1{,}1\cdot10^{-4}$	$1{,}6\cdot10^{-7}$				
		$4{,}0\cdot10^{-3}$	$1{,}5\cdot10^{-4}$	$1{,}4\cdot10^{-7}$				
БуХЭ	ТМА	0	$2{,}1\cdot10^{-4}$	$4{,}3\cdot10^{-6}$	$(4{,}7\pm0{,}2)\cdot10^{-3}$	$(4{,}2\pm0{,}1)\cdot10^{-3}$	$(3{,}0\pm0{,}3)\cdot10^{-2}$	0,14
		$1{,}6\cdot10^{-3}$	$2{,}6\cdot10^{-4}$	$4{,}0\cdot10^{-6}$				
		$2{,}4\cdot10^{-3}$	$2{,}9\cdot10^{-4}$	$3{,}5\cdot10^{-6}$				
		$8{,}0\cdot10^{-3}$	$4{,}5\cdot10^{-4}$	$3{,}4\cdot10^{-6}$				
	ТЭА	0	$2{,}0\cdot10^{-4}$	$5{,}2\cdot10^{-6}$	$(2{,}2\pm0{,}2)\cdot10^{-3}$	$(2{,}4\pm0{,}2)\cdot10^{-3}$		
		$8{,}0\cdot10^{-4}$	$2{,}7\cdot10^{-4}$	$5{,}2\cdot10^{-6}$				
		$4{,}0\cdot10^{-3}$	$4{,}3\cdot10^{-4}$	$5{,}2\cdot10^{-6}$				
		$8{,}0\cdot10^{-3}$	$7{,}1\cdot10^{-4}$	$5{,}2\cdot10^{-6}$				
	ТБА	0	$2{,}0\cdot10^{-4}$	$4{,}0\cdot10^{-6}$	$(2{,}4\pm0{,}2)\cdot10^{-4}$	$(1{,}6\pm0{,}2)\cdot10^{-4}$	$(4{,}9\pm0{,}8)\cdot10^{-4}$	0,33
		$4{,}0\cdot10^{-5}$	$2{,}6\cdot10^{-4}$	$3{,}5\cdot10^{-6}$				
		$8{,}0\cdot10^{-5}$	$2{,}9\cdot10^{-4}$	$4{,}0\cdot10^{-6}$				
		$4{,}0\cdot10^{-4}$	$3{,}8\cdot10^{-4}$	$2{,}7\cdot10^{-6}$				

для БуХЭ. На основании этих данных можно считать, что при взаимодействии ХЭ мух, как и АХЭ, с катионными лигандами важную роль играет ионное взаимодействие катионной группировки с анионным участком фермента. Известно, что анионный участок в активном центре АХЭ играет значительно большую роль, чем у БуХЭ [1]. Можно считать, что по значению анионного участка ХЭ мух сходна с АХЭ.

Как видно из табл. 1 и 2, увеличение размера алкильных радикалов ионов ТАА увеличивает их сродство ко всем трем ферментам. Однако при переходе от ТМА к ТБА чувствительность ХЭ мух к этим лигандам возрастает примерно в 120 раз, в то время как АХЭ только в 36 раз, а БуХЭ—в 26 раз. Полученные данные находятся в соответствии с результатами Krupka, Hellenbrand для ХЭ мозга комнатных мух [7, 16, 18] и могут свидетельствовать о более обширных гидрофобных областях в непосредственной близости анионного центра ХЭ мух по сравнению с АХЭ и БуХЭ.

Кривые зависимости активности растворимой ХЭ мозга капустных мух от концентрации тиохолиновых эфиров имеют максимум при концентрации 0,8—1 мМ субстрата, что указывает на углубление ферментативного действия избытком субстрата [9]. В присутствии ионов ТАА и соединения ПМ-2 в области высоких концентраций субстрата, где наблюдается эффект субстратного торможения, под действием исследуемых лигандов происходит некоторое снижение этого эффекта (рис. 1). Для АХЭ высказано предположение об участии аллостерического центра в субстратном торможении [2, 19—21]. Вероятно, наблюдаемый нами эффект уменьшения субстратного торможения для ХЭ капустных мух обусловлен конкуренцией этих лигандов с катионной группой АТХ за взаимодействие с аллостерическим центром ХЭ мух, в результате чего характерное для ХЭ капустных мух в зоне высоких концентраций субстрата снижение каталитической активности менее выражено. Эти данные указывают на присутствие аллостерического центра и его регуляторную роль в механизме каталитического действия ХЭ мух. Сходные результаты для взаимодействия ХЭ мозга комнатных мух с субстратами и обратимыми ингибиторами получены Hellenbrand, Krupka [22, 18].

Идентификацию типа обратимого ингибирования проводили на основании графического метода Лайнуивера-Берка [12]. В случае смешанного типа торможения вклад конкурентной и бесконкурентной компонент оценивали величинами K_i'—константы конкурентного ингибирования и K_i''—бесконкурентного ингибирования. При взаимодействии ХЭ мух с ТМА и ТЭА выявлялся конкурентный тип действия этих ионов. ТЭА является истинно конкурентным ингибитором, так как при его действии на фермент $V_{макс.}$ не меняется, происходит только увеличение K_m в 3 раза (рис. 2, *б*). Это означает, что ТЭА взаимодействует только со свободным активным центром фермента и препятствует образованию комплекса Михаэлиса АТХ с ХЭ. В случае ТМА наблюдается увеличение K_m в 2 раза и незначительное снижение $V_{макс.}$ (в 1,2 раза). Прямые на графике Лайнуивера-Берка пересекаются в верхнем левом квадранте вблизи оси орди-

нат (рис. 2, *а*). При этом K_i'' в 10 раз превышает $K_i'(\alpha=0{,}1)$. Этот тип ингибирования близок к конкурентному, так как вклад бесконкурентной компоненты значительно ниже конкурентной. Взаимодействие ХЭ мух с ТБА смешанного типа и характеризуется величиной K_i'', превышающей

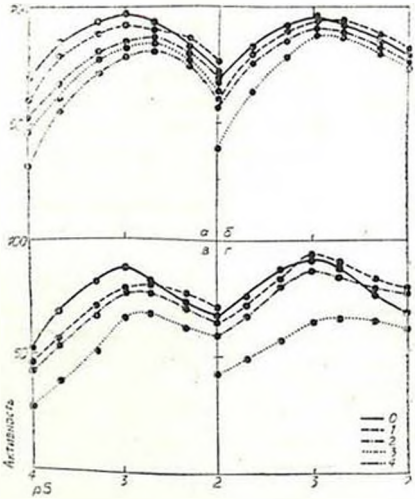


Рис. 1. Зависимость pS-активность для гидролиза АТХ под действием ХЭ мозга капустных мух в отсутствие ингибитора (0) и при разных концентрациях ТМА *(а)*, ТЭА *(б)*, ТБА *(в)*, IM-2 *(г)*. По оси абсцисс—отрицательный логарифм концентрации АТХ, по оси ординат—скорость гидролиза $A(M\cdot10^9\cdot мин^{-1}\cdot мг\ белка^{-1})$. *а* — концентрации ТМА — $4\cdot10^{-4}$ М *(1)*, $1\cdot10^{-3}$ М *(2)*, $2\cdot10^{-3}$ М *(3)*, $4\cdot10^{-3}$ М *(4)*. *б*—концентрации ТЭА—$2\cdot10^{-4}$ М *(1)*, $4\cdot10^{-4}$ М *(2)*, $2\cdot10^{-3}$ М *(3)*. *в*—концентрации ТБА—$2\cdot10^{-6}$ М *(1)*, $4\cdot10^{-6}$ М *(2)*, $1\cdot10^{-5}$ М *(3)*. *г*—концентрации IM-2—$2\cdot10^{-5}$ М *(1)*, $4\cdot10^{-5}$ М *(2)*, $4\cdot10^{-4}$ М *(3)*

K_i' в 4,4 раза ($\alpha=0{,}23$). При смешанном типе торможения может происходить присоединение иона ТАА не только к свободному активному центру фермента, но и к ацетилированному ферменту, у которого свободен анионный участок [22], ион ТАА может сорбироваться также на аллостерическом центре, периферических анионных участках ХЭ вне активного центра [2, 21, 23]. Для БуХЭ механизм взаимодействия с ионами ТАА близок к таковому для ХЭ мух. Для АХЭ исследуемые ионы являются ингибиторами смешанного типа действия, при этом отношения конкурентных компонент торможения к бесконкурентным варьируют в пределах 0,22—0,27. Анализ полученных данных свидетельствует о большей близости ХЭ мух к БуХЭ по типу обратимого действия ТАА.

В табл. 3 приведены результаты взаимодействия мембранной формы ХЭ мух с ионами ТМА и ТБА. Как видно из табл. 1 и 3, величины K_i

Таблица 3

Кинетические параметры для взаимодействия мембранной формы АХЭ мозга капустных мух с тетраметиламмонием (ТМА) и тетрабутиламмонием (ТБА) (pH 7,5; 25°, фосфатный буфер 0,04 М)

Ингибитор	Концентрация ингибитора, М	K_m, М	V, М·мин$^{-1}$ мг белка$^{-1}$	K_i, М	K_i', М	K_i'', М	$\varkappa$
ТМА	0	$6,7\cdot10^{-5}$	$31,0\cdot10^{-6}$	$(6,0\pm0,2)\cdot10^{-4}$	$(2,3\pm0,2)\cdot10^{-4}$	$(1,8\pm0,2)\cdot10^{-3}$	0,13
	$8,0\cdot10^{-5}$	$9,0\cdot10^{-5}$	$30,0\cdot10^{-6}$				
	$4,0\cdot10^{-4}$	$1,1\cdot10^{-4}$	$26,2\cdot10^{-6}$				
	$1,6\cdot10^{-3}$	$1,2\cdot10^{-4}$	$21,4\cdot10^{-6}$				
ТБА	0	$6,5\cdot10^{-5}$	$25,0\cdot10^{-6}$	$(5,6\pm0,7)\cdot10^{-4}$	$(5,1\pm0,7)\cdot10^{-4}$	$(2,1\pm0,3)\cdot10^{-3}$	0,24
	$2,0\cdot10^{-5}$	$9,0\cdot10^{-5}$	$23,0\cdot10^{-6}$				
	$8,0\cdot10^{-5}$	$1,1\cdot10^{-4}$	$21,5\cdot10^{-6}$				
	$1,6\cdot10^{-3}$	$1,2\cdot10^{-4}$	$18,0\cdot10^{-6}$				

для мембранной ХЭ примерно в 2 раза ниже, чем для растворимой ХЭ, то есть мембранная форма фермента оказалась чувствительней растворимой формы к действию ТАА ионов. По механизму действия ионов ТАА обе формы ХЭ близки.

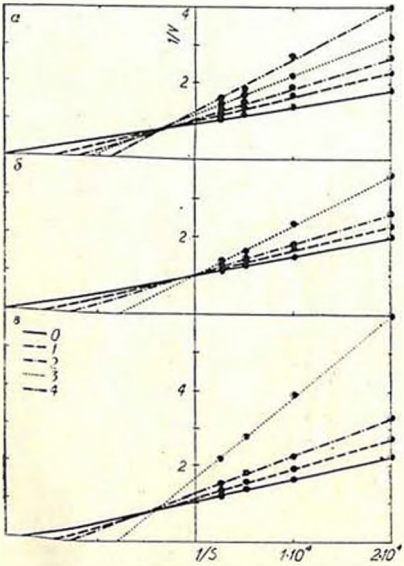
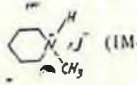
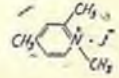


Рис. 2. Зависимость 1/v ($M^{-1} \cdot 10^{-4}$ · мин · мг белка) от 1/S (M^{-1}) для гидролиза АТХ под действием ХЭ мозга капустных мух в отсутствие ингибитора (0) и при разных концентрациях ТМА *(а)*, ТЭА *(б)*, ТБА *(в)*. *а*—концентрации ТМА—$4 \cdot 10^{-4}$ М *(1)*, $1 \cdot 10^{-3}$ М *(2)*, $2 \cdot 10^{-3}$ М *(3)*, $4 \cdot 10^{-3}$ М *(4)*. *б*—концентрации ТЭА—$2 \cdot 10^{-4}$ М *(1)*, $4 \cdot 10^{-4}$ М *(2)*, $2 \cdot 10^{-3}$ М *(3)*. *в*—концентрации ТБА—$2 \cdot 10^{-6}$ М *(1)*, $4 \cdot 10^{-6}$ М *(2)*, $1 \cdot 10^{-5}$ М *(3)*

Для характеристики анионного центра ХЭ мух изучали также действие производных пиридиния ІМ-2 и ІМ-3 на активность фермента. Эти соединения являются обратимыми ингибиторами ХЭ, так как уровень торможения активности фермента устанавливается сразу после добавления ингибитора, зависит от концентрации ингибитора и не нарастает во времени. ІМ-2 и ІМ-3 оказались высоко эффективными ингибиторами ХЭ мух (табл. 4). Ингибитор ІМ-2 действовал, как и в случае БуХЭ, по истинно конкурентному типу. Он был на порядок сильнее, чем для БуХЭ.
ІМ-3 проявлялся наиболее эффективно при действии на АХЭ, с истинно конкурентным типом ингибирования. Его действие на АХЭ в 5 раз превышало таковое для ХЭ мух и в 170 раз—для БуХЭ. ІМ-3 ингибировал ХЭ мух и БуХЭ по смешанному типу. При анализе этих данных видно,

Таблица 4

Кинетические параметры для взаимодействия ХЭ мух, АХЭ и БуХЭ с производными пиридиния  (IM-2)

и  (IM-3) (pH 7,5; 25°, фосфатный буфер 0,04 М)

Фермент	Ингибитор	Концентрация ингибитора, М	K_m, М	V, М·мин$^{-1}$· мг белка$^{-1}$	K_i, М	K_i', М	K_i'', М	α
ХЭ мух	IM-2	0	$5,5\cdot10^{-5}$	$9,5\cdot10^{-6}$	$(3,2\pm0,5)\cdot10^{-5}$	$(3,5\pm0,5)\cdot10^{-5}$		
		$2\cdot10^{-5}$	$1,2\cdot10^{-4}$	$9,5\cdot10^{-6}$				
		$4\cdot10^{-5}$	$1,7\cdot10^{-4}$	$9,5\cdot10^{-6}$				
		$8\cdot10^{-5}$	$2,2\cdot10^{-4}$	$9,5\cdot10^{-6}$				
		$4\cdot10^{-4}$	$3,3\cdot10^{-4}$	$9,5\cdot10^{-6}$				
	IM-3	0	$5,3\cdot10^{-5}$	$9,0\cdot10^{-6}$	$(1,7\pm0,1)\cdot10^{-5}$	$(1,1\pm0,1)\cdot10^{-5}$	$(5,9\pm0,6)\cdot10^{-5}$	0,2
		$4\cdot10^{-6}$	$8,3\cdot10^{-5}$	$8,4\cdot10^{-6}$				
		$8\cdot10^{-6}$	$1,1\cdot10^{-4}$	$7,9\cdot10^{-6}$				
		$4\cdot10^{-5}$	$1,7\cdot10^{-4}$	$6,9\cdot10^{-6}$				
АХЭ	IM-2	0	$0,9\cdot10^{-4}$	$2,1\cdot10^{-7}$	$(2,4\pm0,2)\cdot10^{-4}$	$(1,2\pm0,1)\cdot10^{-4}$	$(6,1\pm0,4)\cdot10^{-4}$	0,2
		$4\cdot10^{-5}$	$1,9\cdot10^{-4}$	$1,8\cdot10^{-7}$				
		$8\cdot10^{-5}$	$1,3\cdot10^{-4}$	$1,4\cdot10^{-7}$				
		$4\cdot10^{-4}$	$1,5\cdot10^{-4}$	$1,2\cdot10^{-7}$				
	IM-3	0	$1,0\cdot10^{-4}$	$2,1\cdot10^{-7}$	$(3,5\pm0,1)\cdot10^{-6}$	$(2,6\pm0,4)\cdot10^{-6}$		
		$8\cdot10^{-7}$	$1,8\cdot10^{-4}$	$2,1\cdot10^{-7}$				
		$1\cdot10^{-6}$	$2,7\cdot10^{-4}$	$2,1\cdot10^{-7}$				
		$4\cdot10^{-5}$	$1,0\cdot10^{-3}$	$2,1\cdot10^{-7}$				
БуХЭ	IM-2	0	$2,1\cdot10^{-4}$	$4,8\cdot10^{-6}$	$(1,6\pm0,1)\cdot10^{-3}$	$(1,9\pm0,2)\cdot10^{-3}$		
		$4\cdot10^{-4}$	$2,4\cdot10^{-4}$	$4,8\cdot10^{-6}$				
		$2\cdot10^{-3}$	$3,3\cdot10^{-4}$	$4,8\cdot10^{-6}$				
		$4\cdot10^{-3}$	$4,5\cdot10^{-4}$	$4,8\cdot10^{-6}$				
	IM-3	0	$2,2\cdot10^{-4}$	$4,3\cdot10^{-6}$	$(6,1\pm0,2)\cdot10^{-4}$	$(4,7\pm0,3)\cdot10^{-4}$	$(1,0\pm0,1)\cdot10^{-3}$	0,5
		$8\cdot10^{-5}$	$2,4\cdot10^{-4}$	$4,0\cdot10^{-6}$				
		$4\cdot10^{-4}$	$2,5\cdot10^{-4}$	$3,2\cdot10^{-6}$				
		$8\cdot10^{-4}$	$2,9\cdot10^{-4}$	$2,7\cdot10^{-6}$				

что по механизму действия соединений IM-2 и IM-3 на исследуемые ферменты наблюдается сходство между ХЭ мух и БуХЭ. Однако большая разница, выше чем на порядок, в действии этих ионов на ХЭ мух по сравнению с БуХЭ является подтверждением более важной роли анионного участка в сорбции на активном центре ХЭ, чем БуХЭ. Высокое сродство ХЭ мух к производным пиридиния позволяет предположить наличие вблизи анионного центра зон, комплементарных циклическим структурам этих соединений.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что активный центр ХЭ капустных мух содержит анионный участок, роль которого в сорбции таких специфических катионсодержащих лигандов, как ионы ТАА, весьма существенна, и по силе ион-ионного взаимодействия он близок к анионному участку АХЭ бычьих эритроцитов. Вместе с тем, ХЭ мух более сходна с типичной БуХЭ млекопитающих, чем с АХЭ, по механизму действия ионов ТАА на их активность. Сравнительный анализ величин K_i для ТАА ионов с различной длиной алкильного радикала $CH_3 \rightarrow C_2H_5 \rightarrow C_4H_9$ показал больший рост при увеличении радикала силы их взаимодействия с ХЭ капустной мухи, чем с АХЭ и БуХЭ, что позволило заключить о более обширных гидрофобных областях в анионном участке ХЭ мух по сравнению с таковыми АХЭ и БуХЭ. Результаты, полученные при взаимодействии ХЭ мух с производными пиридиния, указывают на присутствие вблизи анионного участка ХЭ мух областей, комплементарных циклической структуре этих соединений. Снижение эффекта субстратного торможения активности фермента под действием ионов ТАА и соединения IM-2, а при их низких концентрациях в некоторых случаях активация фермента свидетельствуют о наличии аллостерического центра и его регуляторной роли для ХЭ капустных мух.

INTERACTION OF CHOLINESTERASE FROM BRAIN OF THE CABBAGE FLY *DELIA BRASSICAE* WITH CATIONIC LIGANDS

T. I. KRASNOVA, G. M. GRIGOR'EVA, A. E. KHOVANSKIKH, I. P. LEZHNEVA

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Leningrad, All-Union Research Institute of Plant Protection, VASKHNIL, Leningrad

We studied the interaction of cholinesterase (ChE) from brain of the spring cabbage fly *Delia brassicae*, AChE (EC. 3.1.1.7.) from human erythrocytes and BuChE (EC. 3.1.1.8.) from horse blood serum with tetraalkylammonium (TAA) ions: tetramethylammonium, tetraethylammonium, tetrabuthylammonium as well as pyridinium derivatives-N-methylpyperidinium and 1,2,4.-trimethylpyridinium. The effects of these ions were asessed in terms of the inhibition constant K_i. All ligands used were reversible inhibitors of the studied ChE's. Comparative analysis of the K_i vaiues obtained for different enzymes showed that the fly

ChE was similar to AChE in terms of the innibition by TAA ions. At the same time the fly ChE was more similar to BuChE as regards the interaction mechanism with the ions. Considerable similarity was also found between fly ChE and BuChE in their interaction with pyridinium derivatives. Comparison of the K_i values for tne interaction of the soluble and membrane bound ChE of cabbage fly brain with TAA ions showed the two fold greater affinity of these ions to the membrane-bound form of tne enzyme.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Яковлев В. А.*—В кн.: Кинетика ферментативного катализа, с. 138—246, М., Наука, 1965.
2. *Changeux J. P.* Mol. Pharmacol., № 4, p. 369—392, 1966.
3. *Rosenberry T. L.* Adv. Enzymol., v. 43, p. 103—218, 1975.
4. *Кабачник М. И., Абдувахабов А. А., Атабекова И. Н., Брестkин А. П., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Годына Е. Н., Михайлов С. С., Михельсон М. Я., Розенгарт В. И., Розенгарт Е. В., Ситкевич Р. В.* Успехи химии, т. 39, вып. 6, с. 1050—1072, 1970.
5. *Григорьева Г. М., Конычева Н. В., Абдувахабов А. А.* Биоорган. химия, т. 9, № 8, с. 1040—1046, 1983.
6. *Brestkin A. P., Brick I. L., Grigorjeva G. M.*—In: Intern. Encycl. Pharm. Therap., sect. 85, v. 1, p. 241—344, New Yerk, London, Acad. Press, 1973.
7. *Hellenbrand K., Krupka R. M.* Croat. Chem. Acta, v. 47, № 3, p. 345—353, 1975.
8. *Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е.* Нейрохимия, т. 4, № 2, с. 214—226, 1975.
9. *Григорьева Г. М., Краснова Т. И., Хованских А. Е.* Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т .23, № 1, с. 141—143, 1987.
10. *Григорьева Г. М., Краснова Т. И., Хованских А. Е., Гусев Г. В., Лежнева И. П.* Биохимия, т. 52, вып. 8, с. 1192—1200, 1987.
11. *Ellman G. L., Courtney K. D., Andres Jr. V., Featherstone R. M.* Biochem. Pharmacol., v. 7, № 1, p. 88—89, 1961.
12. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты, с. 289—292, М., Мир, 1966.
13. *Krupka R. M.* Biochem., v. 3, № 4, p. 1749—1755, 1964.
14. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
15. *Григорьева Г. М.* О роли анионного центра активной поверхности холинэстераз. Автореф. канд. дис., М., 1965.
16. *Krupka R. M., Hellenbrand K.* Biochim. et biophys. acta, v. 370, № 1, p. 207—215, 1974.
17. *Брестkин А. П., Винер Т. Н., Розенгарт Е. В.* Биохимия, т. 46, вып. 6, с. 1042—1043, 1981.
18. *Krupka R. M.* Biochim. et biophys. acta, v. 370, № 1, p. 197—207, 1974.
19. *Aldridge W. N., Reiner E.* Biochem. J., v. 115, № 2, p. 147—162, 1964.
20. *Changeux J. P., Leuzinger W., Huchet M.* FEBS Lett., v. 2, p. 77—83, 1968.
21. *Kitz R. J., Braswell L. M., Ginsburg S.* Mol. Pharmacol., v. 6, № 2, p. 106—121, 1970.
22. *Hellenbrand K., Krupka R. M.* Biochem., v. 9, № 21, p. 4665—4672, 1970.
23. *Rosenberry T. L.* Croat. Chem. Acta, v. 47, № 3, p. 235—250, 1975.

Поступила 19. III 1988