

КІНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БУТИРИЛХОЛІНЕСТЕРАЗ, ІММОБІЛІЗОВАНИХ НА ПОВЕРХНЮ рН-ЧУТЛИВИХ ПОЛЬОВИХ ТРАНЗИСТОРІВ, ТА ІНГІБУЮЧИЙ ВПЛИВ НА НИХ СТЕРОЇДНИХ ГЛІКОАЛКАЛОЇДІВ

І. В. БЕНІЛОВА^{1,2}, В. М. АРХИПОВА¹, С. В. ДЗЯДЕВИЧ¹, Н. ЖАФФРЕЗІК-РЕНО²,
К. МАРТЛЕ², О. П. СОЛДАТКІН¹

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;

²Еколь Централь де Ліон, Екуллі, Франція;
e-mail: i_skry@yahoo.com

Досліджено інгібуючу дію стероїдних глікоалкалоїдів α -соланіну, α -чаконіну й томатину на сироваткові бутирилхолінестерази коня та людини, іммобілізовані на поверхні рН-чутливих польових транзисторів. За відсутності інгібіторів визначено оптимум рН та розраховано уявні кінетичні параметри ($\langle K_m \rangle$, $\langle V_{max} \rangle$) іммобілізованих бутирилхолінестераз, використовуючи як субстрат ацетил-та бутирилхолін. Визначено уявні константи інгібування $\langle K_i \rangle$ та коефіцієнти інгібування $i_{0,5}$ обох досліджуваних ферментів, на підставі чого оцінено їхню афінність до даних глікоалкалоїдів. Обговорюється застосування досліджених холінестераз для біосенсорного визначення глікоалкалоїдів у різних середовищах у широкому діапазоні концентрацій (10^{-7} – 10^{-4} М).

Ключові слова: іммобілізовані холінестерази, потенціометричний біосенсор, глікоалкалоїди, оборотні інгібітори, кінетичні константи, афінність.

Взаємодія агрохімікатів та природних пестицидів із ферментами-мішенями ссавців становить значний інтерес для медичної біохімії та медицини з точки зору дослідження механізмів інтоксикації та підбору схеми лікування. З іншого боку, чутливі до ефекторного впливу ксенобіотиків ферменти широко застосовують в сучасній біотехнології як чутливі елементи для створення селективних біокаталітичних сенсорів на основі різноманітних фізичних перетворювачів [1,2]. Прикладом такого аналітичного пристрою є нещодавно розроблений потенціометричний датчик на основі рН-чутливих польових транзисторів та іммобілізованої бутирилхолінестерази сироватки коня для прямого кількісного визначення природних пестицидів – глікоалкалоїдів соланіну та чаконіну в картоплі [3] та томатину в помідорах [4].

Для кількісного визначення токсичної сполуки за допомогою ферментних сенсорів найчастіше використовують експресний інгібіторний аналіз, визначаючи ступінь зменшення відгуку сенсора на додавання субстрату для іммобілізованого фермента-мішені залежно від концентрації інгібітора. Цього, як правило, достатньо для підрахунку вмісту інгібітора в досліджуваних зразках за калібрувальною кривою [5]. Але для оцінки афінності оборотного інгібітора до ферменту недостатньо виз-

начити концентрацію речовини, що зумовлює інгібування реакції на 50%, тобто коефіцієнт інгібування $i_{0,5}$ [6]. Так, у разі повного конкурентного інгібування коефіцієнт $i_{0,5}$ не можна вважати вичерпною характеристикою афінності, оскільки він залежить, зокрема, від початкової концентрації субстрату S_0 , у виборі якої присутня суб'єктивність дослідника, та субстратної константи K_s [6]:

$$i_{0,5} = (1 + S_0/K_s)K_i,$$

де K_i – константа інгібування, тобто константа дисоціації фермент-інгібіторного комплексу, яка є кількісною мірою спорідненості інгібітора до фермента й кількісно дорівнює коефіцієнту $i_{0,5}$ лише у разі повного неконкурентного інгібування [6]. Тому необхідно, насамперед, ідентифікувати тип інгібування.

Холінестераза – це один із ключових ферментів, що відповідають за функціонування нервової системи людей, інших хребетних та комах. Деякі хімічні класи токсинів, такі як пестициди, алкалоїди тощо проявляють себе як оборотні та необоротні інгібітори холінестераз, порушуючи нормальне функціонування людського організму. З іншого боку, оборотні інгібітори холінестераз використовуються для лікування деяких хвороб, наприклад хвороби Альцгеймера [7].

Глікоалкалоїди (рис. 1) – це азотовмісні аналоги сапонінів – стероїдних глікозидів вищих рослин. Вони є натуральними фунгіцидами та інсектицидами картоплі та інших пасльонових, але, з огляду на вживання останніх в їжу, спектр біологічної дії глікоалкалоїдів є ширшим. Загальновизнано, що основні ефекти, що їх здійснюють алкалоїди на організм ссавців – це інгібування холінестераз та пермеабілізація клітинних мембран [8, 9]. Клітинами-мішенями для глікоалкалоїдів є еритроцити, тимоцити, епітеліоцити кишечника тощо, а ферментами-мішенями для тих глікоалкалоїдів, що потрапляють в організм із їжею, є, насамперед, холінестерази крові: бутирилхолінестераза (БуХЕ) сироватки та ацетилхолінестераза (АцХЕ) еритроцитарних мембран [9]. Проте глікоалкалоїди цікаві дослідникам не лише як природні токсини, але й як компоненти з можливими фарма-

кологічними властивостями: по-перше, їхня антихолінестеразна дія може знайти застосування для пролонгування дії міорелаксантів, знеболювальних засобів типу кокаїну та інших препаратів, які розщеплюються холінестеразами [10]; по-друге, показано, що цитотоксична дія алкалоїдів надає деяким із них антиракові властивості [11].

Метою роботи було порівняльне дослідження кінетичних характеристик іммобілізованих бутирилхолінестераз (3.1.1.8) сироватки крові коня та людини та їхньої афінності до найпоширеніших стероїдних глікоалкалоїдів картоплі – соланіну й чаконіну та основному алкалоїду томатів – томатину.

Матеріали і методи

У роботі використовували бутирилхолінестеразу сироватки крові коня з активністю 11,4 U/мг та сироватки крові людини з актив-

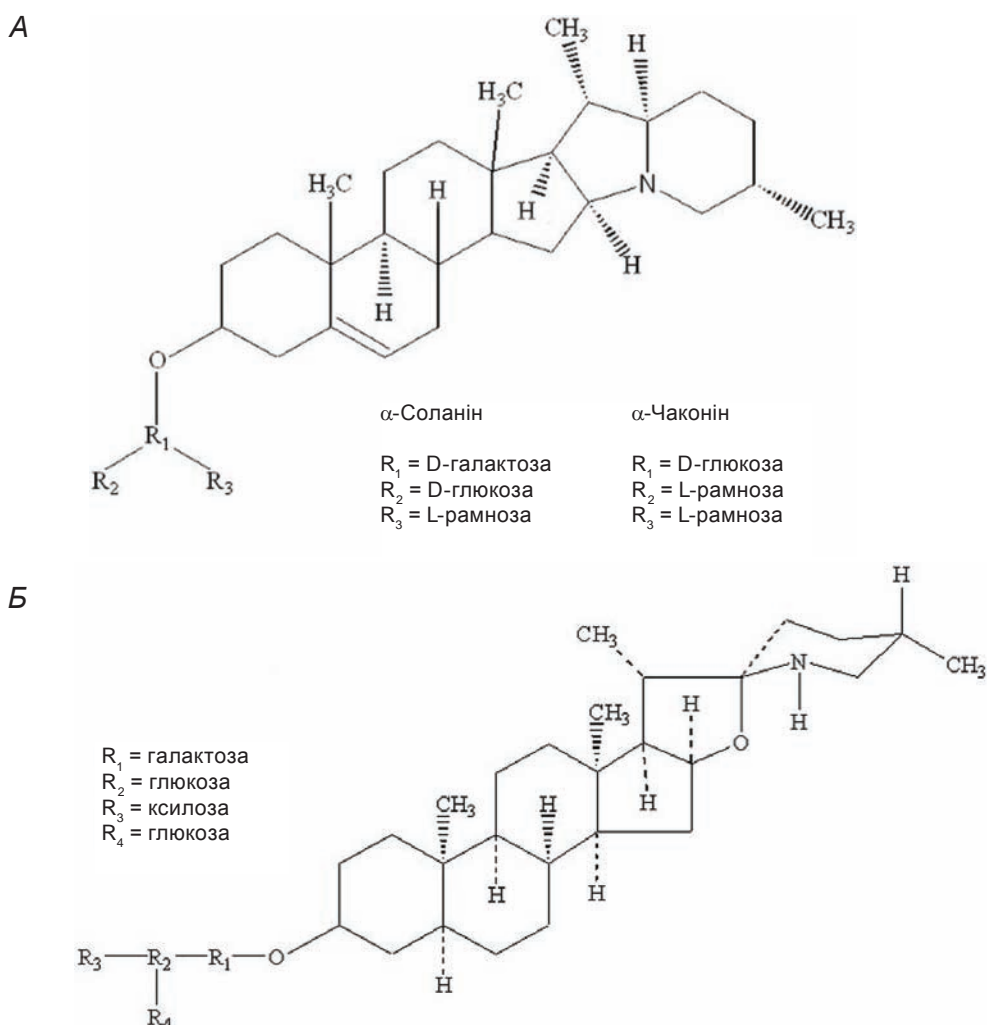


Рис. 1. Структура соланіну і чаконіну (А) та томатину (Б). Стероїдним ядром молекул без вуглеводного залишку є соланідин (А) та томатидин (Б).

ністю 6,3 У/мг, сироватковий альбумін бика (БСА), 25%-й розчин глутарового альдегіду, хлорид бутирилхоліну (БуХХл) та ацетилхоліну (АцХХл), кристалічні глікоалкалоїди α -чаконін (95%-ї чистоти), α -соланін (95%-ї чистоти) з паростків картоплі, томатин (лікоперсицин) (98 % чистоти) виробництва фірми «Sigma-Aldrich Chemie GmbH» (Німеччина). Інші реактиви мали кваліфікацію ос.ч. або х.ч. Всі буферні розчини готували на деіонізованій воді.

Конструкція потенціометричного перетворювача на основі рН-чутливих польових транзисторів. Для вимірювань використовували сенсорний чип на основі рН-чутливих польових транзисторів, розроблений та виготовлений за стандартною кремнієвою технологією в науково-дослідницькому інституті “Мікроприлад” (Київ, Україна). Цей чип – кремнієвий кристал р-типу, розміром 3 мм × 10 мм, на якому розміщено два ідентичних рН-чутливих польових транзистора (рис. 2), було наклеєно на ситалову підкладку розміром 30 мм × 6 мм × 1 мм. Контакти кремнієвої структури було приєднано до відповідних площадок на ситаловій підкладці методом ультразвукового зварювання та ізольовано епоксидною смолою [12].

Іоноселективні властивості транзистора обумовлено шаром Si_3N_4 , нанесеного на його підзатворну область. Чутливість чипа до рН становила 30–40 мВ/рН, що забезпечувало достатню чутливість перетворювача ферментного біосенсора для реєстрації зміни рН у мембрані, яке відбувається у процесі ферментативної

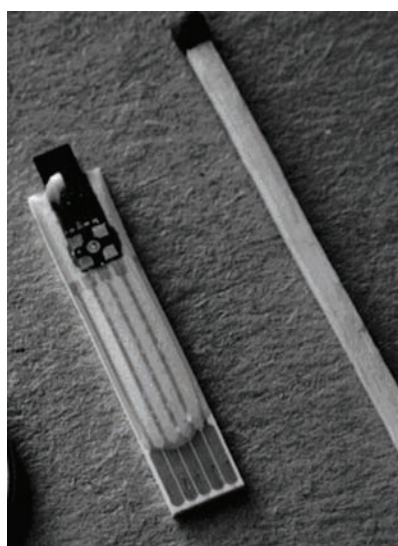


Рис. 2. Зовнішній вигляд потенціометричного перетворювача на основі рН-чутливих польових транзисторів.

реакції. Робочі параметри рН-чутливого польового транзистора: струм витоку $I_B = 100$ мкА, напруга між витоком та стоком $U_{BC} = 1$ В.

Імобілізація ферментів на поверхні перетворювача. Для створення біоматриць за основу був взятий метод імобілізації ферментів, розроблений в нашій лабораторії [3–5]. З цією метою готували розчини ферменту та БСА у 20 мМ фосфатному буфері (рН 7,4) з кінцевими концентраціями 50 мг/мл та змішували у співвідношенні 1 : 1. До суміші фермент-БСА додавали гліцерол до кінцевої концентрації 10% для стабілізації ферменту при імобілізації та запобігання передчасному підсиханню розчину, нанесеного на поверхню перетворювача. Краплю суміші фермент-БСА наносили на одну частину чутливої поверхні перетворювача, на іншу – розчин БСА без ферменту (це був датчик порівняння). Для полімеризації мембран датчики розміщували в атмосфері насичених парів глутарового альдегіду на 20–30 хв. Останній реагує з доступними аміногрупами білків, сприяючи утворенню в мембрані зшивок за типом шиффових основ ($-\text{N}=\text{CH}-$). Після полімеризації датчики підсушували на повітрі й відмивали від надлишку глутарового альдегіду в буферному розчині протягом 10–20 хв.

Схема установки та методика вимірювань. Вимірювання з використанням рН-чутливих польових транзисторів проводили за допомогою стаціонарної експериментальної установки, блок-схему якої наведено на рис. 3.

Перед використанням сенсори з нанесеним біоматеріалом витримували 20 хв у робочому буфері до одержання стабільного сигналу. Скляна комірка для вимірювань мала об'єм 2 мл.

Вихідні розчини глікоалкалоїдів (2 мМ) готували на 5 мМ оцтовій кислоті.

Всі вимірювання проводили при кімнатній температурі з інтенсивним перемішуванням розчину. Для оцінки кінетики функціонування імобілізованих бутирилхолінестераз застосовували такий протокол вимірювань: 1) реєстрували вихідний сигнал (базову лінію) сенсора в робочому буфері; 2) додавали аліквоту розчину субстрату і реєстрували кінетику збільшення сигналу; 3) відмивали сенсор 2–3 рази робочим буфером; 4) сенсор вміщували в буфер, додавали аліквоту розчину інгібітора, запускали реакцію додаванням у комірку субстрату і реєстрували кінетику приросту сигналу; 5) відмивали сенсор 2–3 рази робочим буфером.

Для оцінки ступеня інгібування імобілізованих холінестераз застосовували вимірю-

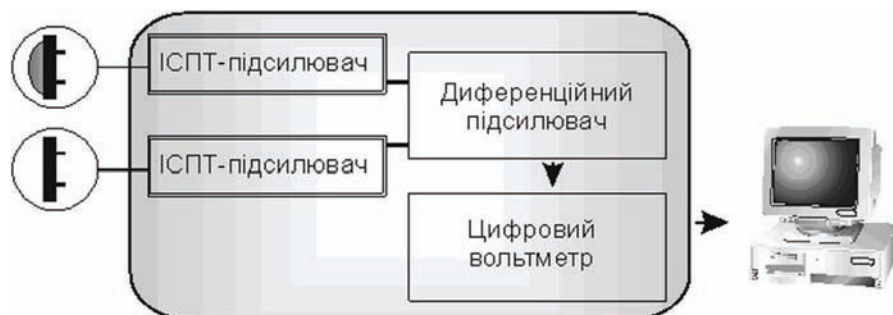


Рис. 3. Схема експериментальної потенціометричної установки для роботи з біосенсорами на основі рН-чутливих польових транзисторів.

вання за аналогічним протоколом, але в стаціонарному режимі.

Похибка вимірів сенсорами даного типу не перевищує 5% [13].

Результати та обговорення

Функція БуХЕ сироватки крові ссавців не є чітко визначеною, але деякі автори вважають цей фермент здатним детоксикувати ксенобіотики за рахунок природної здатності зв'язувати багато низькомолекулярних сполук, зокрема фармакологічні препарати та алкалоїди різної структури з видоспецифічною чутливістю до означених сполук [2, 7, 8].

Іншим ферментом, що інгібується стероїдними глікоалкалоїдами, є АцХЕ – специфічна естераза, фізіологічна функція якої полягає в гідролізі нейромедіатора ацетилхоліну [7]. Теоретично цей фермент можна використовувати наряду з БуХЕ як біологічні компоненти при створенні біокаталітичного сенсора для детекції глікоалкалоїдів. Раніше було протестовано АцХЕ, іммобілізовані на поверхні рН-чутливих транзисторів, одержані з різних джерел: з еритроцитів бика (активність 0,31 У/мг) та з електричного вугря Electric eel (349 У/мг) [13]. Активність еритроцитарного ферменту виявилась недостатньою для потенціометричної реєстрації відгуку на ацетилхолін, тоді як в іншій АцХЕ визначено неміхаелісівську кінетику гідролізу субстрату. До того ж чутливість досліджених ацетилхолінестераз до соланіну та чаконіну виявилась значно слабкішою за таку в сироваткових бутирилхолінестераз [13]. Саме тому для створення біосенсора, чутливого до інгібіторного впливу глікоалкалоїдів, надалі було використано лише бутирилхолінестерази.

В основі роботи біосенсорів з іммобілізованими бутирилхолінестеразами лежить реакція гідролізу бутирилхоліну, в ході якої генеруються протони та змінюється рН у середині ферментної мембрани, що можна зареєструва-

ти за допомогою потенціометричного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів [3–5,12,13].

рН-Оптimum іммобілізованих бутирилхолінестераз. Активність ферментів, а отже і відгук сенсора, істотно змінюються при різних рН робочого розчину, тому цю залежність було досліджено в першу чергу (рис. 4). Визначення рН-оптимуму обох іммобілізованих бутирилхолінестераз проводили в 2,5 мМ багатоконпонентному буфері (полімікс-буфері) [13]. Такий складний буфер було вибрано для того, щоб знехтувати будь-яким впливом буферної ємності на величину відгука: так, буферна ємність полімікс-буфера незмінна в діапазоні рН від 5 до 9 [13]. Як субстрат використали 1 мМ бутирилхолінхлорид.

Встановлено (рис. 4), що рН-оптimum БуХЕ з сироватки крові коня становить 7,3–8,1, БуХЕ з сироватки крові людини – 7,2–7,7. Як видно з рисунку, величини сигналів сенсора в буфері полімікс невеликі, тому надалі робочим буфером було взято 5 мМ фосфатний буфер з рН 7,5, сигнали в якому виявились на порядок більшим.

Відгук біосенсора на 1 мМ БуХХл вивчено при різних значеннях рН за наявності та у відсутності різних глікоалкалоїдів [4, 13]. Відповідно розраховано рівень інгібування ферменту, який не залежав від рН розчину. Ці дані збігаються з результатами, одержаними іншими авторами для холінестеразної активності щодо субстратів та глікоалкалоїдів [2, 15], але відрізняються від результатів з вивчення високої рН-залежності пермеабілізації мембран за впливу глікоалкалоїдів [16,17].

Субстратна специфічність бутирилхолінестераз. Обидві іммобілізовані БуХЕ демонструють кінетику насичення бутирилхоліном за Міхаелісом при концентраціях субстрату 0,25–2,4 мМ (рис. 5, А). Для БуХЕ коня показано інгібування надлишком бутирилхоліну

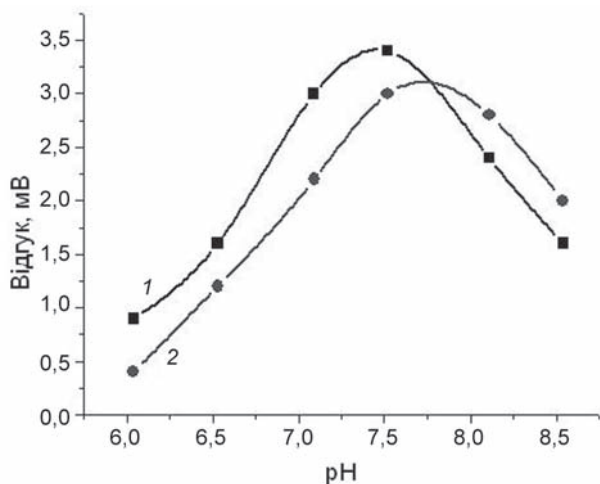


Рис. 4. Залежність від рН відгуку потенціометричного біосенсора на основі іммобілізованої бутирилхолінестерази із сироватки крові людини (1) та коня (2). Вимірювання проводили в 2,5 мМ полімікс-буфері (концентрація бутирилхолінхлориду 1 мМ).

(більше 15 мМ) і відсутність інгібування ацетилхоліном (рис. 5, Б).

Уявні K_m ($<K_m>$) розраховували за методами Лайнуївера-Берка, Іді-Хофсті та Ханса-Вульфа (рис. 6), беручи середній результат трьох незалежних вимірювань. Встановлено, що іммобілізована БуХЕ коня має практично однакову спорідненість до бутирил- й ацетилхоліну ($<K_m>$ дорівнюють 1,0 та 0,9 мМ відповідно), але гідроліз бутирилхоліну ($<V_{max}>=102,2$ мВ/хв) відбувається в 2,5 раза швидше, ніж гідроліз

ацетилхоліну ($<V_{max}>=40,4$ мВ/хв). Іммобілізована БуХЕ людини за меншої питомої активності також демонструє майже однакову спорідненість до бутирил- та ацетилхоліну ($<K_m>$ дорівнюють 0,3 та 0,4 мМ відповідно), тоді як максимальні швидкості гідролізу бутирилхоліну ($<V_{max}>=25,4$ мВ/хв) та ацетилхоліну ($<V_{max}>=7,8$ мВ/хв) відрізняються в 3,2 раза на користь бутирилхоліну.

Одержані величини добре корелюють із константами Міхаеліса, одержаними іншими дослідниками в подібних умовах [18–20] для розчинених сироваткових БуХЕ коня та людини. Це певною мірою свідчить про відсутність значних конформаційних змін іммобілізованих у парах глутарового альдегіду бутирилхолінестераз.

Інгібіторна специфічність холінестераз. На рис. 7 наведено залежність відгуків біосенсора на бутирилхолінхлорид до (1) та після (2) інкубації з α -чаконіном разом із кривою інгібування іммобілізованої БуХЕ сироватки коня цим алкалоїдом (3). Рівень інгібування визначався як відносне зменшення відгуку біосенсора на субстрат у присутності інгібітора. Добре видно, що найкраща чутливість до інгібітора спостерігається при малих концентраціях субстрату (0,2–1,2 мМ). Це можна розцінювати як одну з ознак конкурентного інгібування. Для дуже низьких концентрацій субстрату ($<0,1$ мМ) інгібіторний ефект проявляється меншою мірою, тому що фермент у мембрані знаходиться в надлишку по відношенню до субстрату і тільки частина його відповідає за перетворення субстрату (тобто надлишок фер-

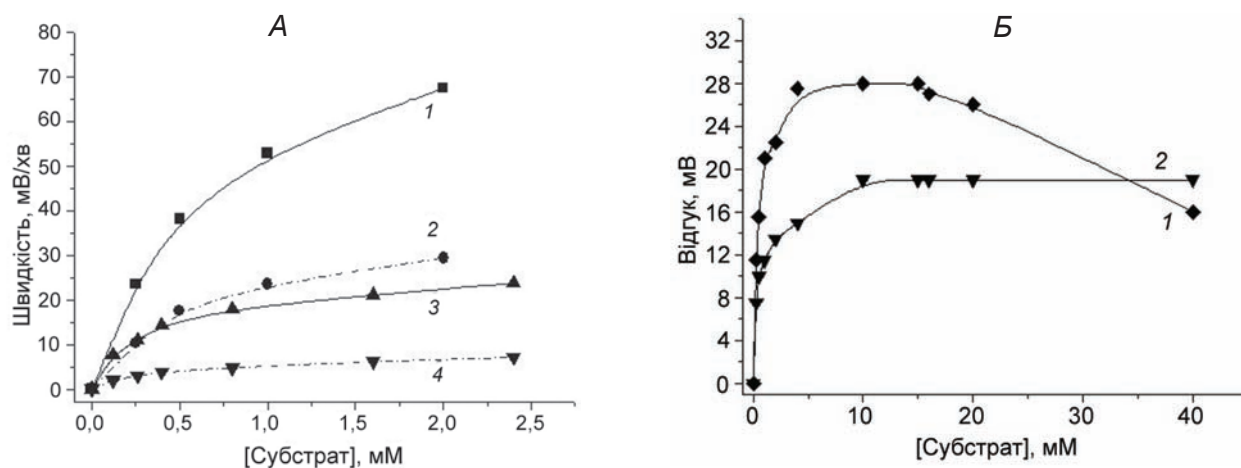


Рис. 5. Залежність відгуку потенціометричного біосенсора на основі іммобілізованої бутирилхолінестерази з сироватки крові коня (1, 2) та людини (3, 4) від концентрацій АцХХл (2, 4) та БуХХл (1, 3). Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері при рН 7,5 в кінетичному (А) та стаціонарному (Б) режимах вимірювання.

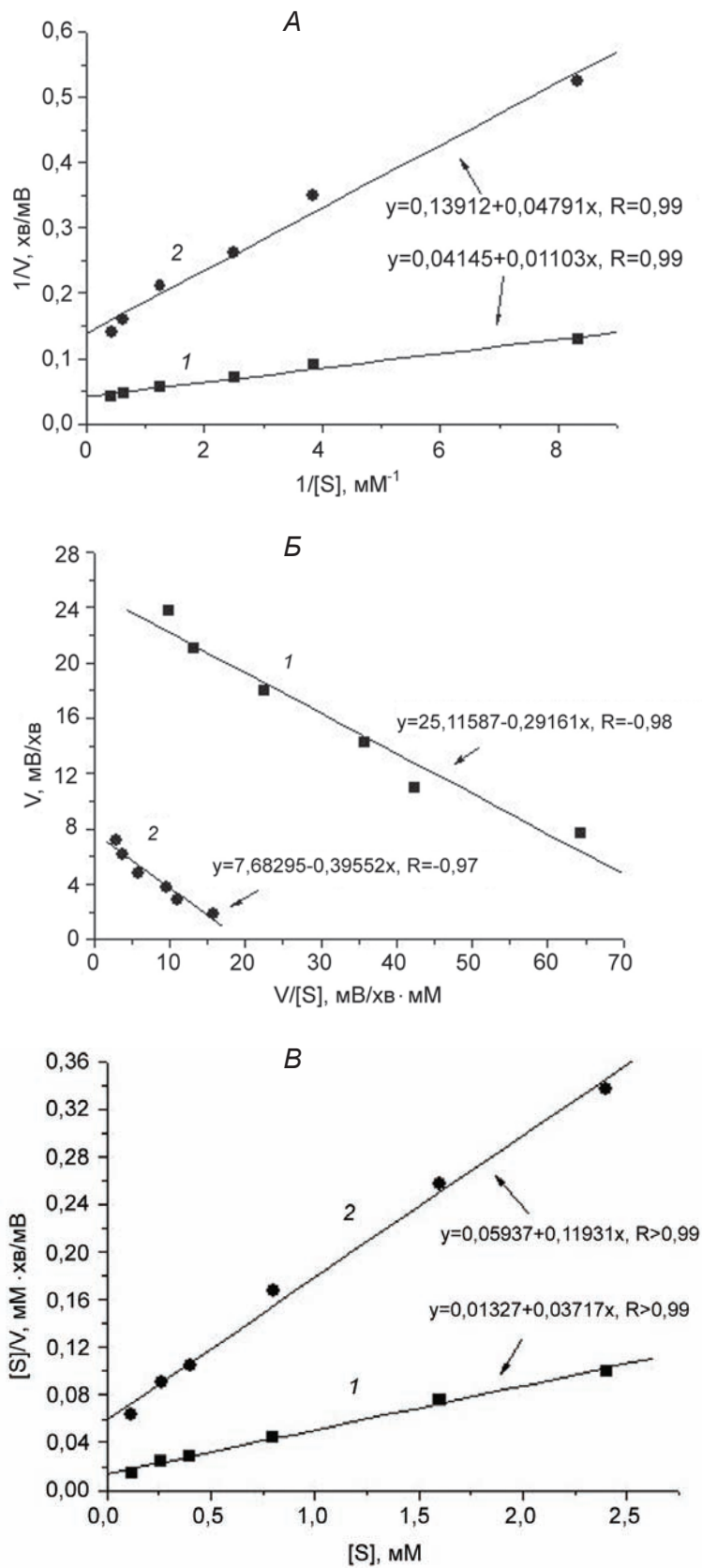


Рис. 6. Розрахунок кінетичних констант іммобілізованої БуХЕ сироватки крові людини графічними методами Лайнуївера-Берка (А), Іді-Хофсті (Б) та Ханса-Вульфа (В): 1 – бутирилхолінхлорид, 2 – ацетилхолінхлорид.

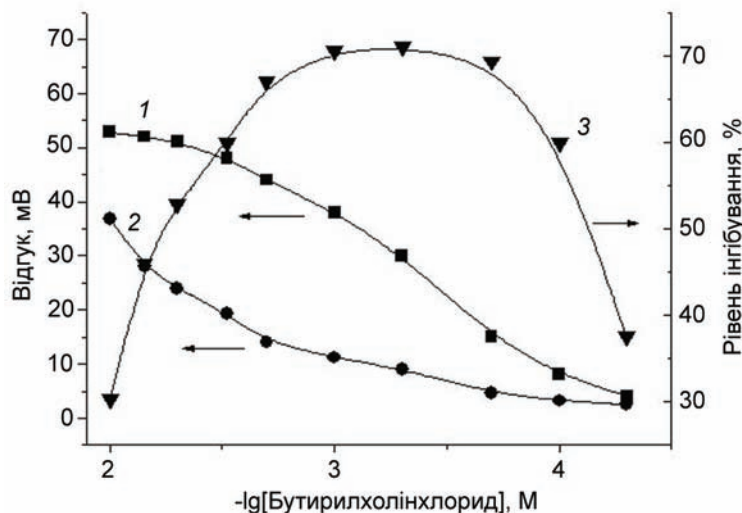


Рис. 7. Відгуки біосенсора на бутирилхолінхлорид до (1) та після (2) інкубації з 20 мкМ α -чаконіну; (3) – залежність рівня інгібування іммобілізованої БуХЕ сироватки коня від концентрації субстрату.

менту не бере участі у ферментативній реакції). В цьому випадку молекули ферменту, які зв'язуються з інгібітором, можуть компенсуватися тими вільними молекулами ферменту, що до цього моменту не брали участь у ферментативній реакції. Внаслідок цього експериментально одержане зменшення відгуку біосенсора буде меншим за реальне зменшення активності ферменту за рахунок інгібіторного ефекту. Такий ефект є типовим для всіх іммобілізованих ферментів незалежно від механізму їхнього інгібування чи методу визначення активності ферменту [21].

Для подальшого аналітичного визначення концентрацій глікоалкалоїдів із використанням БуХЕ сироватки крові коня було вибрано

БуХХл у концентрації 1 мМ, що дорівнює уявній константі Міхаеліса даної іммобілізованої БуХЕ. За цієї концентрації субстрату фермент має практично максимальну чутливість до інгібітора і відгук сенсора на додавання бутирилхоліну є досить великим.

Аналогічні наведеним на рис. 7 дані було одержано і для інших глікоалкалоїдів [4, 13]. Також було продемонстровано відсутність впливу на рівень інгібування часу інкубації сенсора з глікоалкалоїдами, що свідчить про оборотність інгібування іммобілізованих бутирилхолінестераз [13].

Таким чином, у процесі досліджень було з'ясовано, що інгібування обох бутирилхолінестераз глікоалкалоїдами є повністю або час-

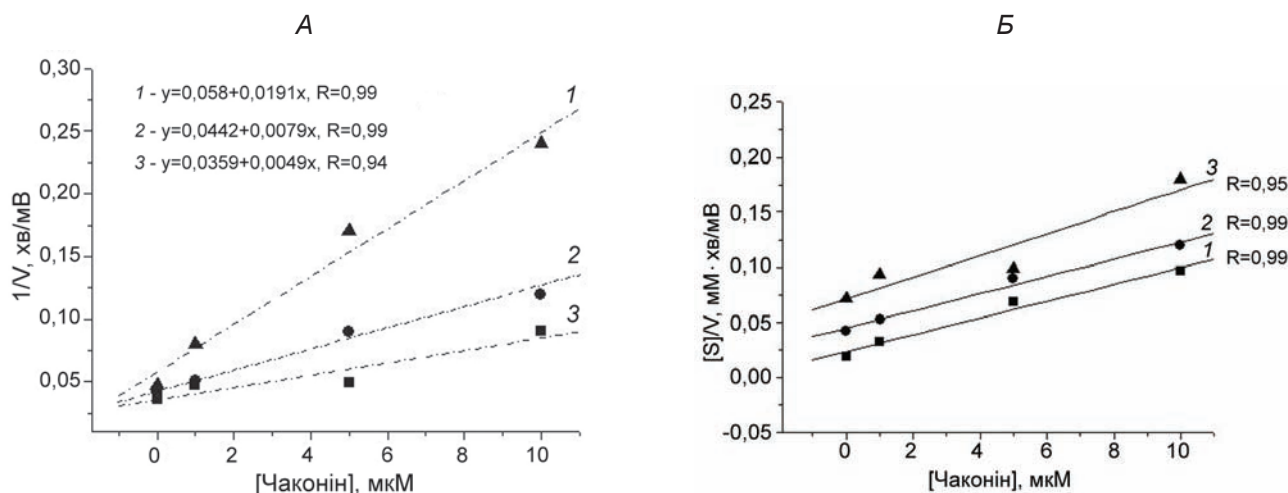


Рис. 8. Кінетика інгібування іммобілізованої БуХЕ з сироватки крові коня в координатах Діксона (А) та Корніш-Боудена (Б): 1 – 0,4 мМ БуХХл, 2 – 1 мМ БуХХл, 3 – 2 мМ БуХХл.

Уявні кінетичні параметри іммобілізованої бутирилхолінестерази сироватки крові коня та людини за середнім арифметичним трьох послідовних вимірювань із відхиленням не більше 5%

Інгібітор	БуХЕ коня		БуХЕ людини		$\langle K_i \rangle$, мкМ
	$i_{0,5}$, мкМ		$i_{0,5}$, мкМ		
	1 мМ БуХХл	$\langle K_i \rangle$, мкМ	0,2 мМ БуХХл	1 мМ БуХХл	
Чаконін	11,2	1,4	0,2	0,3	0,2
Соланін	27,9	3,3	0,3	0,5	0,2
Томатин	11,9	1,7	0,9	1,2	1,3

тково конкурентним. Про це свідчить той факт, що максимальна швидкість реакції з інгібітором і без нього має практично однакове значення при різних концентраціях субстрату (рис. 7), а відгук сенсора не залежить від часу інкубації з інгібітором.

Встановлено, що дія всіх досліджуваних інгібіторів по відношенню до обох ферментів є оборотною.

Тип інгібування соланіном, чаконіном та томатином визначали у класичних координатах Діксона та іншим, менш поширеним графічним методом, запропонованим у 1974 р. А. Корніш-Боуденом для визначення інгібіторних констант при змішаному, безконкурентному та неконкурентному типах інгібування [14]. Надалі, обговорюючи координати Корніш-Боудена, ми матимемо на увазі залежність $[S]/V$ від $[i]$, де $[i]$ – концентрація інгібітора [14].

Для БуХЕ із сироватки крові коня показано повне конкурентне інгібування соланіном, чаконіном та томатином (рис. 8). У координатах Діксона лінеаризовані криві перетинаються у другому квадранті, в той же час у координатах Корніш-Боудена прямі є практично паралель-

ними, що свідчить про конкурентний характер інгібування. Це означає, що параметр $i_{0,5}$ не можна використовувати для оцінки афінності кожного з глікоалкалоїдів до даного фермента. Тому окрім $i_{0,5}$ було розраховано константи інгібування кожним із досліджуваних глікоалкалоїдів графічним методом Діксона (таблиця). З цією метою було обрано концентрації субстрату, що відповідали величинам $0,5 < K_m >$, $1 < K_m >$ та $2 < K_m >$.

У випадку БуХЕ із сироватки крові людини ідентифікувати тип інгібування виявилось важче (рис. 9): у координатах Діксона томатин показав конкурентне інгібування (прямі перетинаються у другому квадранті), тоді як прямі в координатах Корніш-Боудена очевидно перетинаються у третьому квадранті, що разом свідчить швидше про змішаний тип інгібування. $\langle K_i \rangle$ розраховували в координатах Діксона за даними, одержаними для концентрації субстрату 0,152 мМ та 0,3 мМ, що відповідає величинам $0,5 < K_m >$ та $1 < K_m >$. Виявилось, що чутливість БуХЕ людини до томатину не дуже відрізняється від такої БуХЕ коня, оскільки відповідні $\langle K_i \rangle$ практично збігаються.

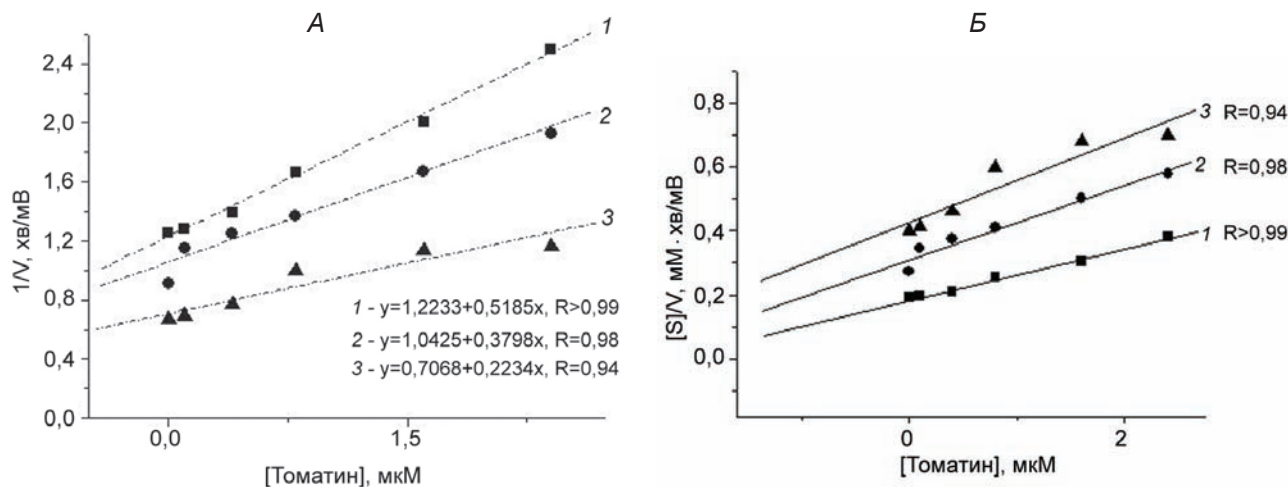


Рис. 9. Кінетика інгібування іммобілізованої БуХЕ з сироватки крові людини в координатах Діксона (А) та Корніш-Боудена (Б): 1 – 0,152 мМ БуХХл, 2 – 0,3 мМ БуХХл, 3 – 0,6 мМ БуХХл.

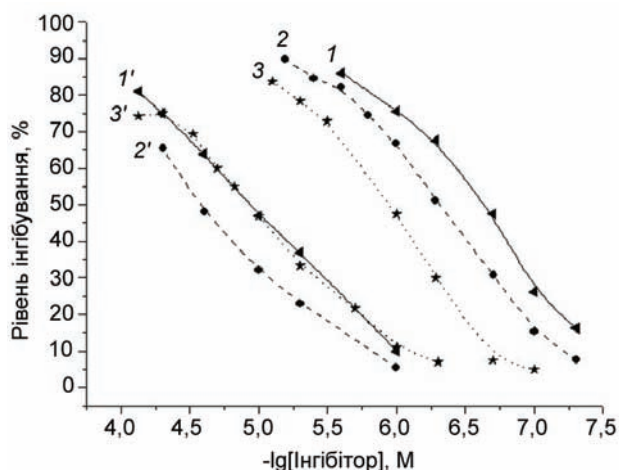


Рис. 10. Калібрувальні криві біосенсора на основі БуХЕ з сироватки крові коня (1', 2', 3') та людини (1, 2, 3) для визначення концентрацій α -чаконіну (1', 1), α -соланіну (2', 2) та томатину (3', 3). Вимірювання проведені в 5 мМ фосфатному буфері при рН 7,5, концентрація БуХХл складала 1 мМ.

Змішане інгибування демонструють соланін та чаконін, до яких БуХЕ людини виявляється на порядок чутливішою порівняно з БуХЕ коня.

Для БуХЕ людини було також розраховано $i_{0,5}$ за концентрацій субстрату 0,2 мМ та 1 мМ, що відповідає приблизно $0,6 <K_m>$ та $3 <K_m>$. Як видно з таблиці, у разі збільшення концентрації субстрату величина $i_{0,5}$ для кожного інгібітора зростає, що певною мірою свідчить про конкурентний характер інгибування. Але вплив чисто конкурентного інгібітора, що присутній в концентрації, яка дорівнює K_i , на фермент, який працює на половині максимальної швидкості, має повністю нівелюватися шляхом подвоєння концентрації субстрату з K_m до $2K_m$ [22]. У випадку БуХЕ коня рівень інгибування за наявності ГА в концентраціях, що дорівнюють їхнім $<K_i>$, та концентрації субстрату, що дорівнює $<K_m>$, не перевищує 15% (рис. 10). У випадку БуХЕ людини за концентрації субстрату, що відповідає $3 <K_m>$, рівень інгибування трьома ГА становить близько 40% (рис. 10), що свідчить про нечисто конкурентний характер інгибування.

На рис. 10 представлено калібрувальні криві для визначення різних глікоалкалоїдів. Імобілізована БуХЕ людини на порядок чутливішою до інгібуючого впливу соланіну та чаконіну порівняно з БуХЕ коня. Це дозволяє використовувати кожний з цих ферментів для біосенсорного аналізу глікоалкалоїдів залежно від очікуваного вмісту їх в досліджуваному середовищі. Так, у разі потенціометричного аналізу картоплі [5] або томатів [4] на підвищений вміст глікоалкалоїдів (>150 мг/кг сирової ваги, [5]) доцільніше використовувати БуХЕ коня. При розробці біокаталітичного сенсора для аналізу вмісту глікоалкалоїдів у сироватці чи плазмі крові свавців, де наявність наномольних концентрацій цих ксенобіотиків може стати важливим діагностичним показником [9], як біологічний елемент краще обрати високочутливу БуХЕ людини.

Таким чином, нами було визначено, що при оптимальному рН іммобілізовані бутирилхолінестерази із сироватки крові коня та людини виявляють міхаелісівську кінетику гідролізу ацетилхоліну та бутирилхоліну у спектрі концентрацій 0,2–2,4 мМ. Імобілізована БуХЕ коня інгибується бутирилхоліном у разі наявності останнього в концентрації більше ніж $15 <K_m>$. Глікоалкалоїди соланін, чаконін і томатин проявляють оборотний та конкурентний характер інгибування іммобілізованої БуХЕ із сироватки коня та змішаний, якщо БуХЕ із сироватки людини. За величиною уявної K_i , розрахованої графічним методом Діксона, обидва ферменти виявились однаково чутливими до інгібуючої дії томатину, а БуХЕ людини на порядок чутливіша до чаконіну та соланіну, ніж БуХЕ коня. Найпотужнішим інгібітором обох БуХЕ виявився чаконін, найменш сильним для БуХЕ коня – соланін, для БуХЕ людини – томатин. Істотно різна чутливість БуХЕ коня та людини до глікоалкалоїдів дозволяє масштабувати чутливість біосенсора залежно від практичних потреб.

Автори висловлюють щире подяку членкореспонденту НАН України проф. С. О. Костеріну за цінні зауваження і критичне обговорення представленої роботи.

**КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗ,
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ
НА ПОВЕРХНОСТЬ
рН-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ
ПОЛЕВЫХ ТРАНЗИСТОРОВ, И
ИНГИБИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ
НА НИХ СТЕРОИДНЫХ
ГЛИКОАЛКАЛОИДОВ**

*И. В. Бенилова^{1,2}, В. М. Архипова¹,
С. В. Дзядевич¹, Н. Жаффрезик-Рено²,
К. Мартле², А. П. Солдаткин¹*

¹Институт молекулярной биологии и
генетики НАН Украины, Киев;

²Еколь Централь де Лион, Экулли, Франция;
e-mail: i_skry@yahoo.com

Исследовано ингибиторное действие стероидных гликоалкалоидов α -соланина, α -чаконина и томатина на сывороточные бутирилхолинэстеразы лошади и человека, иммобилизованные на поверхность рН-чувствительных полевых транзисторов. В отсутствие ингибиторов определен рН-оптимум и рассчитаны кажущиеся кинетические параметры ($\langle K_m \rangle$, $\langle V_{max} \rangle$) иммобилизованных бутирилхолинэстераз с использованием в качестве субстрата ацетил- и бутирилхолина. Определены кажущиеся константы ингибирования $\langle K_i \rangle$ и коэффициенты ингибирования $i_{0,5}$ обоих исследуемых ферментов, на основании чего оценена их аффинность к данным гликоалкалоидам. Обсуждается применение исследованных холинэстераз для биосенсорного определения гликоалкалоидов в разных средах в широком диапазоне концентраций (10^{-7} – 10^{-4} М).

Ключевые слова: иммобилизованные холинэстеразы, потенциометрический биосенсор, гликоалкалоиды, обратимые ингибиторы, кинетические константы, аффинность.

**KINETIC PROPERTIES
OF BUTYRYLCHOLINESTERASES
IMMOBILISED ON рН-SENSITIVE
FIELD-EFFECT TRANSISTOR
SURFACE AND INHIBITORY ACTION
OF STEROIDAL GLYCOALKALOIDS
ON THESE ENZYMES**

*I. V. Benilova^{1,2}, V. M. Arkhypova¹,
S. V. Dzyadevych¹, N. Jaffrezic-Renault²,
C. Martelet², A. P. Soldatkin¹*

¹Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Ecole Centrale de Lyon, Ecully Cedex, France;
e-mail: i_skry@yahoo.com

S u m m a r y

The inhibitory action of steroid glycoalkaloids α -solanine, α -chaconine and tomatine on horse and human serum butyryl cholinesterases immobilized on the pH-sensitive field-effect transistors has been studied. Using acetyl- and butyryl choline as substrates, the optimal pH and the apparent kinetic parameters ($\langle K_m \rangle$, $\langle V_{max} \rangle$) of immobilized butyryl cholinesterases have been calculated in the absence of inhibitors. The affinity of each enzyme to glycoalkaloids has been estimated from calculation of apparent inhibition constants $\langle K_i \rangle$ and inhibition coefficients $i_{0,5}$. Application of the studied cholinesterases for biosensoric determination of glycoalkaloids in the wide range of concentrations (10^{-7} – 10^{-4} M) in different media has been discussed.

Key words: immobilized cholinesterases, potentiometric biosensor, glycoalkaloids, reversible inhibitors, kinetic constants, affinity.

1. *Handbook* of biosensors and electronic noses: medicine, food, and environment / Kress-Rogers E. – New York: CRC Press, 1997. – 720 pp.

2. Imato T., Ishibashi N. // Biosens. Bioelectron. – 1995. – **10**. – P. 435–441.
3. Soldatkin A. P., Arkhypova V. N., Dzyadevych S. V. et al. // Talanta. – 2005. – **66**. – P. 28–33.
4. Dzyadevych S. V., Arkhypova V. N., Soldatkin A. P. et al. // Anal. Lett. – 2004. – **37**, N 8. – P. 1–14.
5. Arkhypova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. et al. // Sens. Actuators B. – 2004. – **103**. – P. 416–422.
6. Костерін С. О., Прилуцький Ю. І., Бориско П. О., Мірошніченко М. С. // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 1. – С. 113–125.
7. Giacobini E. // Pharm. Research. – 2004. – **50**. – P. 433–440.
8. Khalid A., Haq Z., Anjum S. et al. // Bioorg. Med. Chem. – 2004. – **12**. – P. 1995–2003.
9. Nigg N., Ramos L., Graham E. et al. // Fund. Appl. Toxicol. – 1996. – **33**. – P. 272–281.
10. Schwarz M., Glik D., Loewenstein Y., Soreq H. // Pharmac. Ther. – 1995. – **67**, N 2. – P. 283–322.
11. Kuo K., Hsu S., Li Y. et al. // Biochem. Pharmacol. – 2000. – **60**, N 12. – P. 1865–1873.
12. Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Korpan Y. I. et al. // Anal. Bioanal. Chem. – 2003. – **377**. – P. 496–506.
13. Arkhypova V. N., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. et al. // Biosensors Bioelectron. – 2003. – **18**. – P. 1047–1053.
14. Cornish-Bowden A. // Biochem. J. – 1974. – **37**, N 1. – P. 143–144.
15. Roddick J. G. // Phytochemistry. – 1989. – **28**. – P. 2631–2634.
16. McKee R. // J. Gen. Microbiol. – 1959. – **20**. – P. 686–696.
17. Roddick J. G., Rijnenberg A. L. // Physiol. Plantarum. – 1986. – **68**. – P. 436–440.
18. Main A., Tarkan E., Aull J., Soucie W. // J. Biol. Chem. – 1972. – **247**. – P. 566–571.
19. Kovacs K., Szajani B., Boross L. // J. Appl. Biochem. – 1982. – **4**. – P. 11–18.
20. Reiner E., Simeon-Rudolf V., Skrinjaric-Spoljar M. // Toxicol. Lett. – 1995. – **82/83**. – P. 447–452.
21. Immobilized enzymes: an introduction and applications in biotechnology / Trevan M. D. – New York: John Wiley & Sons, 1980. – 138 pp.
22. Cornish-Bowden A. // Biochem. Soc. Trans. – 1999. – **27**. – P. 281–284.

Отримано 18.10.2005