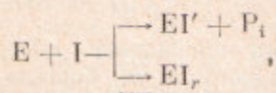


А. П. БРЕСТКИН, И. Л. БРИК, Р. И. ВОЛКОВА, Н. Н. ГОДОВИКОВ,
Х. Х. ГУРДАЛИЕВ, академик М. И. КАБАЧНИК, Н. А. КАРДАНОВ
КОМБИНИРОВАННОЕ ТОРМОЖЕНИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ
ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ ЭФИРАМИ
ДИФЕНИЛФОСФИНОВОЙ И ДИФЕНИЛТИОФОСФИНОВОЙ
КИСЛОТ

Недавно Олдридж и Рейнер ⁽¹⁾ показали, что для некоторых кумаринилфосфатов наблюдаются два вида торможения каталитической активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ): необратимое, прогрессирующее, обусловленное фосфорилированием активного центра фермента, и обратимое, непрогрессирующее, связанное, по их мнению, с взаимодействием ингибитора с участком активной поверхности, ответственным за торможение АХЭ избытком субстрата.

Такой сложный вид торможения (который мы в дальнейшем будем называть комбинированным), согласно Олдриджу и Рейнер, протекает по схеме:



где E — фермент, I — фосфорорганический ингибитор, EI' — фосфорилированный фермент, скорость образования которого определяется величиной бимолекулярной константы скорости k_a , EI_r — обратимый фермент-ингибиторный комплекс, концентрация которого зависит от равновесной константы его диссоциации $K_{i,r}$. Из этой схемы следует уравнение:

$$k = \frac{k_a}{1 + [I]/K_{i,r}} = \frac{1}{[I]t} \ln \frac{[E]_0}{[E]_t}, \quad (1)$$

где k — бимолекулярная константа скорости при данной концентрации ингибитора $[I]$, во много раз превышающей начальную концентрацию фермента $[E]_0$, а $[E]_t$ — концентрация фермента в реакционной смеси через t мин., причем величины $[E]_0$ и $[E]_t$ складываются из концентраций фермента свободного и связанного в комплексе EI_r .

Комбинированный вид торможения проявляется прежде всего в том, что при повышении $[I]$ наблюдается существенное снижение величины экспериментальной бимолекулярной константы скорости k_{II} , вычисляемой по уравнению:

$$k_{II} = \frac{1}{[I]t} \ln \frac{v_0}{v_t}, \quad (2)$$

где v_0 — скорость ферментативного гидролиза субстрата S в отсутствие ингибитора, а v_t — то же самое через t мин. инкубации фермента с ингибитором. Наиболее надежным показателем комбинированного вида торможения является отсутствие инкубационного периода при понижении каталитической активности фермента ингибитором. Поскольку обратимое торможение проявляется не только в реакции фосфорилирования, но и в реакции ферментативного гидролиза субстрата, где оно оценивается ингибиторной константой $K_{i,s}$, то начальная активность фермента v_0 оказывается ниже активности этого фермента в отсутствие ингибитора v_0 при прочих равных условиях.

Если обратимое торможение и в этом случае происходит по конкурентному типу, тогда в присутствии ингибитора

$$v_{0,i} = \frac{a_c [E]_0 [S]}{K_M (1 + [I]/K_{i,s}) + [S]} \quad \text{и} \quad v_t = \frac{a_c [E]_t [S]}{K_M (1 + [I]/K_{i,s}) + [S]},$$

в отсутствие ингибитора

$$v_0 = a_c [E]_0 [S] / (K_M + [S]).$$

Отсюда следует, что при одинаковой концентрации субстрата $[S]$ и при прочих равных условиях (температура, pH, состав реакционной смеси), обеспечивающих постоянство константы Михаэлиса K_M и активности каталитического центра a_c , только отношение v_0/v_t равно $[E]_0/[E]_t$, тогда как

$$\frac{v_0}{v_t} = \frac{[E]_0}{[E]_t} \left(1 + \frac{K_M [I]}{K_{i,s} (K_M + [S])} \right) = \frac{[E]_0}{[E]_t} n. \quad (3)$$

Таким образом, в случае комбинированного торможения, k_{II} , вычисляемая по уравнению (2), дает неправильное представление о скорости необратимого ингибирования фермента. Действительно, после подстановки значения v_0/v_t из формулы (3) в уравнение (2) получаем:

$$k_{II} = \frac{1}{[I]t} \ln \frac{[E]_0}{[E]_t} + \frac{1}{[I]t} \ln n;$$

а в силу уравнения (1) имеем

$$k_{II} = \frac{1}{[I]t} \ln \frac{v_0}{v_t} = k + \frac{1}{[I]t} \ln n... \quad (4)$$

Рис. 1. Зависимость $\lg(v_0/v_t)$ от t для соединения КР-30, $[AX] = 2 \cdot 10^{-2}$ мол/л. Концентрации ингибитора (мол/л): $1 \cdot 10^{-5}$ (а), $3 \cdot 10^{-5}$ (б), $4 \cdot 10^{-5}$ (в), $5 \cdot 10^{-5}$ (г).

Как показывает выведенное нами уравнение (4), величина k_{II} больше экспериментальной бимолекулярной константы скорости k при данном значении $[I]$ на определенную величину, которая наглядно выявляется графическим путем (рис. 1); экспериментальная прямая проходит не через начало координат, как это имеет место при отсутствии обратимого торможения, а выше. При этом отрезок b , отсекаемый на оси ординат, равен $\lg n$, а $\lg \alpha$ — тангенс угла наклона прямых к оси абсцисс равен $[I]k/2,3$, так как из уравнения (4) следует $\lg v_0/v_t = [I]kt/2,3 + \lg n$.

Величина $\lg \alpha$ на рис. 1 дает возможность рассчитать значение k при данном $[I]$, а отрезок b значение $K_{i,s}$; так как $(v_0/v_t)_{t=0} = n = 1 + K_M[I] / [K_{i,s}(K_M + [S])]$, откуда

$$K_{i,s} = K_M[I] / [(K_M + [S])(n - 1)]. \quad (5)$$

Из значений k при различных $[I]$ легко определить истинную бимолекулярную константу k_a и ингибиторную константу $K_{i,r}$. Поскольку из уравнения (1) следует:

$$1/k = 1/k_a + [I]/k_a K_{i,r}, \quad (6)$$

то зависимость $1/k$ от $[I]$ должна выражаться прямой, которая на оси ординат отсекает отрезок равный $1/k_a$ и на оси абсцисс отрезок равный $K_{i,r}$, а тангенс угла наклона к оси абсцисс будет равен $1/k_a K_{i,r}$.

Комбинированный вид торможения обнаружен нами при изучении действия некоторых дифенилфосфинатов и дифенилтиофосфинатов на бутирилхолинэстеразу из сыворотки крови лошадей (БухЭ) (табл. 1).

Антихолинэстеразную активность определяли методом потенциометрического титрования в обычных условиях.

При оптимальной концентрации ацетилхолина АХ равной $1,6-2,0 \cdot 10^{-2}$ М определяли активность фермента v_0 в отсутствие ингибитора и v_t — после инкубации фермента с ингибитором. Для тиофосфинатов экспериментальные прямые проходили под углом к оси абсцисс и пересекали ось ординат выше нуля, что свидетельствовало о наличии комбинированного вида торможения (рис. 1). Фосфинаты давали прямые, параллельные оси t , т. е. торможение не увеличивалось во времени, что свидетельствовало о наличии только обратимого торможения.

В случае комбинированного торможения получали прямые для нескольких концентраций фосфорорганического ингибитора (ФОИ), причем для каждой $[I]$ определяли v_i при 4–5 различных значениях t . Для высоких $[I]$ варьировали в пределах 1–10 мин, а при низких — $[I]$ — в пределах 10–180 мин. Величину отрезка b использовали для вычисления $K_{i,s}$ (рис. 1) по формуле (5). По найденным из графика рис. 1 величинам k находили истинную бимолекулярную константу скорости k_a и ингибиторную константу $K_{i,r}$ (см. формулу (6) и рис. 2).

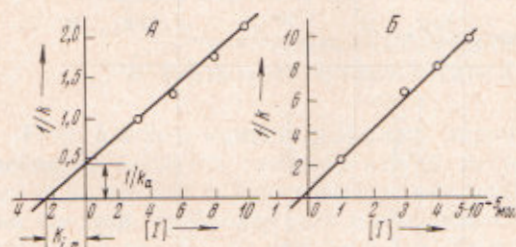


Рис. 2

Рис. 2. Графическое определение k_a и $K_{i,r}$ для соединения КГ-30; А — $[AX] = 1 \cdot 10^{-3}$ мол/л, В — $[AX] = 2 \cdot 10^{-2}$ мол/л

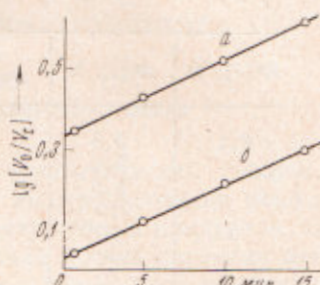


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость $\lg(v_0/v_i)$ от t для соединения КГ-30 при концентрациях АХ $1 \cdot 10^{-3}$ мол/л (а) и $2 \cdot 10^{-2}$ мол/л (б). $[I] = 1 \cdot 10^{-3}$ мол/л

При наличии только обратимого торможения ингибиторные константы K_i определяли графическим методом Лайнуивера и Берка из зависимости $1/v$ от $1/[S]$. Концентрацию АХ в реакционной среде при этом варьировали в пределах $1 \cdot 10^{-1} - 1 \cdot 10^{-2}$ мол/л, как при определении v_0 , так и при определении v_i — скорости ферментативной реакции в присутствии двух различных концентраций обратимого ингибитора. Все конечные результаты исследования представлены в табл. 1. В табл. 2 для тиофосфината КГ-30 приведены данные, по которым графически находили значения k_a и $K_{i,r}$ (рис 2) и вычисляли средние $K_{i,s}$.

Исследованные тиофосфинаты оказались относительно сильными ингибиторами БУХЭ комбинированного вида действия. Величины их бимолекулярных констант скорости близки по значению к таковым для известных производных О-этил-метилтиофосфоновой и диэтилфосфорной кислот (^{3, 4}). По силе же обратимого действия они значительно превосходят такие типичные обратимые ингибиторы, как тетраалкиламмониевые ионы. Ингибиторные константы тиофосфинатов примерно на порядок ниже величины K_i для их кислородных аналогов, которые являются только обратимыми ингибиторами (табл. 1).

Таблица 1
Кинетические константы торможения бутирилхолинэстеразы
дифенилтиофосфинатами $(C_6H_5)_2P(O)S(CH_2)_2R$ и дифенилфосфинатами
 $(C_6H_5)_2P(O)O(CH_2)_2R$

R	Дифенилтиофосфинаты				Дифенилфосфинаты	
	Шифр	k_a , л·моль ⁻¹ ·мин ⁻¹	$K_{i,s}$, М	$K_{i,r}$, М	Шифр	K_i , М
SC_4H_9	КГ-30	$2,5 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-3}$	КГ-24	$1,2 \cdot 10^{-5}$
$\oplus S(CH_3)C_4H_9 \cdot I^-$	КГ-30Б	$1,5 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^{-7}$	$4,8 \cdot 10^{-7}$	КГ-24Б	$1,8 \cdot 10^{-6}$
$N(CH_3)C_4H_9 \cdot m-CH_3$	ГГ-41	$5,0 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$4,1 \cdot 10^{-8}$	ГГ-24	$3,9 \cdot 10^{-6}$
$\oplus N(CH_3)_2C_6H_5 \cdot m-CH_3I^-$	ГГ-41А	$1,0 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^{-8}$	$5,5 \cdot 10^{-8}$	ГГ-24А	$5,8 \cdot 10^{-7}$

У исследованных тиофосфинатов обратимое ингибирование происходит по конкурентному типу, о чем свидетельствует постоянство вычисленной по формуле (5) величины $K_{i,s}$ при разных [I] и наличие прямой пропорциональности (5) между $1/k$ и [I] (рис. 2). При снижении [S] в 20 раз при данном [I] угол наклона прямой к оси t сохраняется (рис. 3), а величина отрезка b уменьшается, т. е. проявляется защитная функция

Таблица 2

Данные кинетики комбинированного торможения бугирилхолинэстеразы дифенилтиофосфинатом КГ-30 при двух различных концентрациях ацетилхолина

$10^2 [S], M$	$10^4 [I], M$	$10^{-3} k, \text{ л. моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	$10^4 K_{i,s}, M$	$10^4 \alpha, \text{ л. моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	$10^4 K_{i,r}, M$
0,1	3,3	10	5,6	2,5	2,3
	5,6	7,5	4,7		
	8,0	5,8	5,4		
	10	4,6	4,3		
2	10	4,2	5,6	2,5	2,1
	30	1,5	2,8		
	40	1,2	2,9		
	50	1,1	2,1		

субстрата против обратимого ингибирования фермента ФОИ, что опять-таки характерно для конкурентного типа торможения.

Таким образом, типичные для комбинированного вида торможения результаты были получены нами в опытах с другим ферментом и с другими по химическому строению ФОИ, чем в опытах Олдриджа и Рейнер. Это дает основание полагать, что комбинированный вид торможения весьма распространен в реакциях холинэстераз с ФОИ, но не всегда может быть выявлен экспериментально. Действительно, если для ФОИ обратимое торможение выражено слабо ($K_{i,s}$ и $K_{i,r}$ порядка 10^{-3} — $10^{-2} M$), то при малых [I], при которых проводятся опыты с активными ФОИ, член $(1 + [I]/K_{i,r})$ в уравнении (1) и член $\{1 + K_m[I] / (K_{i,s}(K_m + [S]))\}$ в уравнении (3) практически не отличаются от единицы.

Наличие обратимого ингибирования в реакциях фосфорилирования фермента можно объяснить стерическими препятствиями при образовании фермент-ингибиторного комплекса Михаэлиса EI. При сорбции на активной поверхности холинэстеразы ингибиторов, а возможно и субстратов, на такой поверхности не всегда происходит необходимая ориентация эфирной связи относительно эстеразного пункта. При неправильной ориентации молекулы ФОИ на активном центре не может произойти последующего фосфорилирования, и образующийся в этом случае вместо комплекса Михаэлиса фермент-ингибиторный комплекс EI, аналогичен комплексу, который получается при действии на фермент обратимых ингибиторов, например, тетраалкиламмониевых ионов. Исследованные тиофосфинаты дают весьма прочные комплексы EI, благодаря наличию в их составе двух, а в соединениях ГГ (см. табл. 1) трех фенильных радикалов, значительно усиливающих гидрофобное взаимодействие ФОИ с БУХЭ, которая имеет сравнительно обширные гидрофобные области как в районе анионного, так и в районе эстеразного пунктов (6).

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова

Академии наук СССР, Ленинград

Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР, Москва

Поступило
5 III 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. N. Aldridge, E. Reiner, Biochem. J., 115, 147 (1969). ² В. А. Яковлев, Кинетика ферментативного катализа, гл. 10, «Наука», 1965, стр. 142. ³ А. П. Бресткин, И. Л. Брик и др., ДАН, 163, 365 (1965). ⁴ А. П. Бресткин, Р. И. Волкова и др., Изв. АН СССР, сер. хим., 1968, 2028. ⁵ Г. М. Григорьева, Биохимия, 30, 415 (1965). ⁶ М. И. Кабачник и др., Усп. хим., 39, 1050 (1970).