

УДК 577.150.8 : 577.153.4 : 615.785.4

БИОХИМИЯ

В. Д. ТОНКОНИЙ, Н. В. САВАТЕЕВ, А. П. БРЕСТЯНИН, А. Н. ПАНОВ

ОБ ОПРЕДЕЛЕНИИ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗ В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОБРАТИМЫХ ИНГИБИТОРОВ

(Представлено академиком Е. М. Крепом 27 II 1972)

Некоторые обратимые ингибиторы холинэстераз (ХЭ), в том числе галантамин, такрин и др., находят широкое применение в клинике и экспериментальных исследованиях. При изучении связи между антихолинэстеразной активностью обратимых ингибиторов (I) и их биологическим действием чрезвычайно важно знать степень угнетения фермента (j) в различных органах и тканях организма после инъекции этих ингибиторов. Величина j представляет собой отношение концентрации ХЭ, связанной в фермент-ингибиторный комплекс $[EI]$, к общей концентрации фермента $[E]_0$ и в случае ингибитора конкурентного типа выражается формулой

$$j = \frac{[EI]}{[E]_0} = \frac{[I]}{K_i + [I]}, \quad (1)$$

где $[I]$ — концентрация ингибитора в исследуемой ткани, а K_i — ингибиторная константа.

Казалось бы, величину j проще всего определять по снижению активности ХЭ пробы ткани по отношению к субстрату, например, ацетилхолину (АХ). Если концентрация субстрата $[S]$ относительно мала и еще не снижает каталитической активности фермента (торможение избытком субстрата, характерное для ацетилхолинэстеразы), то отношение v_0 — скорости ферментативной реакции до введения I к v_i — скорости ферментативной реакции после введения I в организм животного — описывается уравнением

$$\frac{v_0}{v_i} = 1 + \frac{[I]_s}{K_i} \frac{K_m}{K_m + [S]} = 1 + \frac{[I]}{K_i n} \frac{K_m}{K_m + [S]}, \quad (2)$$

где $[I]_s$ — концентрация ингибитора в реакционной смеси, которая меньше концентрации ингибитора в пробе за счет ее разведения в n раз при приготовлении реакционной смеси. После подстановки в эту формулу экспериментально найденного отношения v_0/v_i легко вычислить значение $[I]/K_i$ и далее искомую величину j .

Однако такой метод определения j не может обеспечить получения сколько-нибудь надежных результатов из-за неизбежного разбавления исследуемой ткани (величина n) и защитного действия субстрата в случае конкурентного ингибитора (член $K_m/(K_m + [S])$). Даже при разведении ткани в 10 раз, неизбежным для ткани с высокой активностью ХЭ, тормозящее действие содержащегося в ней обратимого ингибитора понижается настолько, что становится невозможным установить различие между v_0 и v_i , т. е. найти истинную величину угнетения фермента.

Наиболее часто применяемый для определения активности ХЭ метод Хестрина⁽¹⁾ или его модификации предусматривают как значительные разведения источника фермента (ткань мозга, например, разводится в 90—100 раз), так и использование относительно высокой концентрации субстрата АХ: $2-3 \cdot 10^{-3} M$.

Метод потенциометрического титрования с двумя бюретками позволяет создавать и поддерживать на постоянном уровне более низкую концентрацию АХ $1 \cdot 10^{-5} M$ ⁽²⁾, но и в этом случае не удастся избежать значительного разведения ткани. В результате этого величины угнетения ХЭ обратимыми ингибиторами в опытах на животных значительно снижены, а в ряде случаев торможение вообще не выявляется, несмотря на наличие у животных выраженного антихолинэстеразного эффекта ^(3, 4).

При разработке нами метода определения активности ХЭ после воздействия обратимых ингибиторов была использована их способность тормозить скорость реакции ХЭ с фосфорорганическими ингибиторами необратимого действия ⁽⁵⁻⁷⁾. Как известно ⁽⁸⁾, при добавлении обратимого ингибитора бимолекулярная константа скорости взаимодействия ХЭ и фосфорорганическими ингибиторами (ФОИ) понижается согласно формуле

$$K_{II, i} = \frac{K_{II}}{1 + [I]/K_i} \quad (3)$$

где K_{II} — бимолекулярная константа в отсутствие обратимого ингибитора, $K_{II, i}$ — то же в присутствии обратимого ингибитора. Величины K_{II} и $K_{II, i}$ находят по экспериментально определяемым скоростям ферментативного гидролиза при стандартных условиях (рН, температура, солевой состав, исходная концентрация пробы фермента и концентрация субстрата):

$$K_{II} = \frac{2.3}{[J]t} \lg \frac{v_0}{v_t} \quad (4)$$

$$K_{II, i} = \frac{2.3}{[J]t} \lg \frac{v_i}{v_{t, i}} \quad (5)$$

где $[J]$ — концентрация ФОИ, v — соответствующие скорости ферментативного гидролиза: в отсутствие ингибиторов v_0 , после инкубации с ФОИ v_t , в присутствии обратимого ингибитора v_i , в присутствии обратимого ингибитора с последующей инкубацией с ФОИ $v_{t, i}$.

Если $[J]$ и t в опытах одинаковы, то после деления уравнения (4) на уравнение (5) и с учетом формулы (3) имеем

$$\frac{K_{II}}{K_{II, i}} = 1 + \frac{[I]}{K_i} = \frac{\lg v_0/v_t}{\lg v_i/v_{t, i}} \quad (6)$$

Таким образом, согласно предлагаемому нами методу значение члена $1 + [I]/K_i$, а затем и искомую величину i находят по изменению скорости холинэстеразного гидролиза АХ после добавления к исследуемой ткани ФОИ в отсутствие обратимого ингибитора (контроль) и на фоне введенного животному обратимого ингибитора (эксперимент). Исходя из формулы (6) и с учетом формулы (1) величина торможения ХЭ (в %) обратимыми ингибиторами ($i\%$) равна

$$i\% = 100 - \frac{\lg v_i/v_{t, i} \cdot 100}{\lg v_0/v_t} \quad (7)$$

В предлагаемой методике в качестве необратимого ингибитора ХЭ избран армин вследствие его доступности, устойчивости к гидролизу даже в разбавленных растворах и высокой активности. В соответствии с предложенной методикой проведены опыты на животных (собаки, крысы, мыши) по определению угнетения ХЭ в крови и мозге после инъекции обратимых ингибиторов ХЭ (галантамина и такрина). В случае определения угнетения ХЭ крови пробу ее брали до введения обратимого ингибитора у интактного животного, устанавливали активность ХЭ (v_0) по методу Хестрина и подбирали концентрацию армина, необходимую для снижения активности фермента до 5—15% (v_i). После введения животным обратимого ингибитора через определенное время вновь отбирали кровь и определяли активность ХЭ в отсутствие армина (v_t) и при инкубации с ним при 37°

в течение 30 мин. (v_i). Полученные величины использовались для вычисления по формуле (7) величины истинного торможения ХЭ обратимым ингибитором. При этом исключалось влияние разведений (к 1 мл цельной крови добавляли 0,05 мл армина) и защитного действия АХ (фермент с обратимым и необратимым ингибиторами инкубировали без субстрата). Ниже приводятся данные торможения активности ХЭ (в %) цельной крови собак через 15 мин. после внутривенного введения галантамина*:

Доза галантамина (мг/кг)	0,5	2,0
Армин	92,3±3,9	95,7±5,7
Галантамин + армин	73,3±5,5	62,0±5,2
Торможение (j)	51,3±4,0	71,7±0,7

При определении степени угнетения фермента в мозге методика проведения опыта аналогична вышеописанной. При этом армин добавляется или к гомогенату минимально разведенной ткани (в 2—3 раза), или непосредственно растирается с тканью мозга. Приводим данные (в %) торможения активности ХЭ мозга мышей после внутрибрюшинного введения такрина и данные торможения активности ХЭ мозга крыс через 1 час после введения галантамина:

Время после введения (мин.)	30	60	120
Армин	96,3±0,7	95,7±4,8	96,7±1,3
Такрин (5 мг/кг) + армин	65,7±1,2	65,3±5,2	79,7±3,8
Торможение (j)	70,0±0,8	63,3±3,2	56,0±0,8

Доза галантамина (мг/кг)	3,0	5,0
Армин	89,3±4,1	90,0±0,7
Галантамин + армин	66,3±2,3	27,0±4,8
Торможение (j)	51,0±1,35	87,0±1,3

Следует отметить, что во всех опытах при исследовании ингибции ХЭ методом Хестрина или потенциометрического титрования не удалось определить снижения активности фермента ($v_0 = v_i = 100\%$). При использовании же предложенной методики удалось установить значительное торможение активности ХЭ крови и мозга, причем найденные величины торможения находились в соответствии с симптомами отравления антихолинэстеразными веществами (тремор, саливация, судороги и т. д.).

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова
Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
21 III 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Hestrin, J. Biol. Chem., 180, 2, 249 (1949). ² J. Jensen-Holm, H. H. Lausen et al., Acta pharmacol. et toxicol., 15, 384 (1959). ³ М. Я. Михельсон, Действие наркотиков на холинэстеразу, Л., 1948. ⁴ Я. С. Смусин, Судебно-медицинская экспертиза отравлений антихолинэстеразными веществами, М., 1968. ⁵ A. S. V. Burgen, Brit. J. Pharmacol., 4, 3, 219 (1949). ⁶ J. A. Cohen, P. J. Warringa, B. R. Boyens, Biochim. et biophys. acta, 6, 3, 469 (1951). ⁷ J. F. Scaife, Canad. J. Biochem., 38, 3, 301 (1960). ⁸ Г. М. Григорьева, Биохимия, 30, 2, 415 (1965).

* Средние величины вычислены на основании данных 6—9 опытов.