

Е. К. БАЛАШОВА, В. И. РОЗЕНГАРТ, Т. С. ФРЕЙДЛИН,  
О. Е. ШЕРСТОБИТОВ

## УСИЛЕНИЕ СУБСТРАТНОГО ТОРМОЖЕНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЕЗАРЯЖЕННЫХ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 28 X 1974)

В настоящее время можно считать установленным, что ацетилхолинэстераза (АХЭ) (КФ 3.1.1.7) относится к числу аллостерических ферментов (<sup>1</sup>), причем интересно, что в качестве аллостерического эффектора может выступать сам субстрат — ацетилхолин (<sup>2</sup>). Еще в 1968 году было установлено (<sup>3</sup>), что АХЭ содержит анионные участки, расположенные вне каталитического центра, но способные связывать ацетилхолин. Эти и некоторые другие данные послужили основанием для развития представления о том, что давно известная способность избытка ацетилхолина тормозить активность АХЭ объясняется именно «аллостерическим» действием ацетилхолина на регуляторные, лежащие вне активного центра участки молекулы фермента, в результате чего происходит изменение конформации, препятствующее проявлению каталитического эффекта (<sup>4</sup>). Это представление получило широкое распространение (<sup>5, 6</sup>).

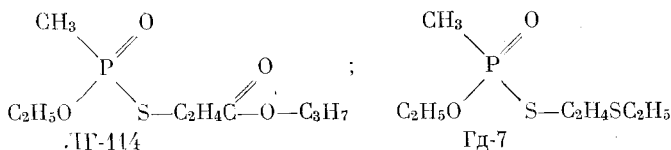
Существует много данных о том, что целый ряд веществ, в частности органических и неорганических катионов, взаимодействует с регуляторными центрами АХЭ, конкурируя с ацетилхолином, в результате чего субстратное торможение заметно ослабевает или исчезает вовсе. Таким действием обладают  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  (<sup>7, 8</sup>), тетраэтиламмоний (<sup>9</sup>), пентаметоний (<sup>5</sup>), некоторые реактиваторы холинэстеразы, например ТМБ-4, токсогонин (<sup>10</sup>) и другие вещества. Многие из перечисленных соединений являются ингибиторами холинэстеразы обратимого действия. Специальный интерес представляют данные (<sup>11</sup>), согласно которым высоко избирательный бисчетвертичный ингибитор АХЭ — вещество 284 С 51 В.В. в низкой концентрации ( $10^{-6}$  М) более чем на 2 порядка повышает оптимальную концентрацию ацетилхолина для действия АХЭ эритроцитов человека, т. е. очень резко ослабляет субстратное торможение.

Приведенные данные позволяют прийти к заключению, что субстратное торможение является хорошей моделью для выявления аллостерических эффекторов АХЭ.

Все изученные до настоящего времени аллостерические эффекторы АХЭ являются катионами, из чего следует, что в регуляторных центрах имеется анионный пункт. Для более полной характеристики регуляторных центров представляло интерес изучение действия на АХЭ и незаряженных соединений. Однако в литературе практически отсутствуют сведения о возможности аллостерического действия на АХЭ таких соединений, в частности избирательных фосфорорганических ингибиторов (ФОИ).

Задача настоящей работы и состояла в изучении влияния концентрации субстрата на антихолинэстеразный эффект ФОИ, а также в поиске таких условий, при которых ФОИ могли бы за счет аллостерического механизма оказывать влияние на угнетение АХЭ избытком субстрата.

Методы. В качестве ингибиторов в большой части опытов использовали вещества ЛГ-114 (12) и ГД-7 (13):



В отдельных опытах были изучены также вещество ГА-95 (О-гексил-S-гексилметилтиофосфонат) и вещество ГА-59 (О-этил-S-этилмеркаптоэтилметилтиофосфонат). Все ФОИ были синтезированы в лаборатории акад.

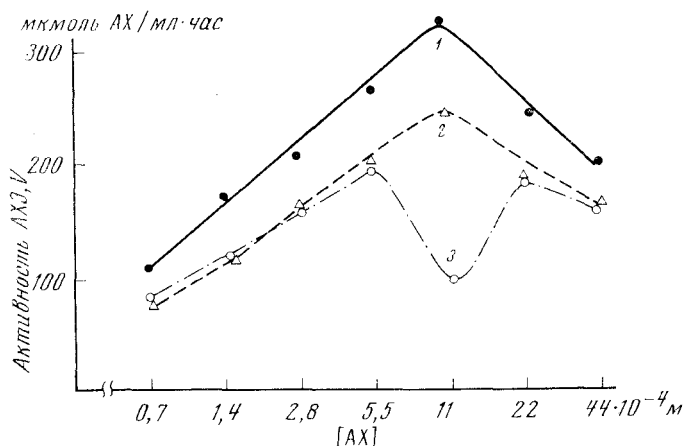


Рис. 1. Активность АХЭ эритроцитов человека. 1 — контроль (без добавления ФОИ), 2, 3 — после инкубации с ЛГ-114 ( $3,9 \cdot 10^{-8}$  M) в течение 1 мин. (2 — после инкубации с ФОИ эритроциты отмыты, 3 — без отмыwania). Ось абсцисс — логарифмическая шкала

М. И. Кабачника в Институте элементоорганических соединений АН СССР. Источником АХЭ служили отмытые от плазмы эритроциты крови человека или кролика. Использование неразрушенных эритроцитов позволяло проводить опыты с отмыwанием ингибитора для оценки обратимости его действия. В ряде опытов применяли очищенный препарат АХЭ из эритроцитов человека производства Пермского научно-исследовательского института вакцин и сывороток. В качестве БУХЭ (КФ 3.1.1.8) использовали очищенный препарат ХЭ из сыворотки крови лошади производства Московского научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова.

Предварительные опыты показали, что интересующий нас эффект наблюдался только при использовании низких концентраций ФОИ и при очень кратковременной инкубации ФОИ с ферментом. ФОИ применяли в конечной концентрации  $10^{-6}$ – $10^{-8}$  M, длительность инкубации составляла 1 мин. при комнатной температуре. Для прекращения реакции между ферментом и ФОИ пробу сильно разводили, добавляя к ней буферный раствор, содержащий нужную концентрацию ацетилхолина. В части опытов перед добавлением ацетилхолина эритроциты отмыwали от ФОИ путем 3-кратного размешивания с 15 объемами физиологического раствора и последующего центрифугирования.

Активность АХЭ определяли по методу Хестрина (14). При использовании низких концентраций субстрата уменьшали продолжительность инкубации проб с ацетилхолином и применяли большие кюветы. Фотометрию осуществляли на спектрофотометре СФ-4 при длине волны 520 нм или на фотоэлектрокалориметре ФЭК-М (зеленый фильтр).

Результаты и их обсуждение. На разных препаратах фермента и при воздействии различных ФОИ мы получили весьма сходные данные, которые в зависимости от постановки опыта, отличались лишь количественно. Результат типичной серии опытов представлен на рис. 1. Из рисунка видно, что в отсутствие ингибитора зависимость активности фермента от концентрации субстрата (кривая 1) имеет типичную для АХЭ колоколообразную форму. Максимум активности наблюдается при концентрации ацетилхолина  $1 \cdot 10^{-3} M$ . После 1-минутной инкубации с ЛГ-114 (кривая 2) характер зависимости  $v$  от  $[S]$  резко меняется: появляются два максимума, а между ними — отчетливо выраженный минимум, который соответствует оптимальной концентрации ацетилхолина в отсутствие инги-

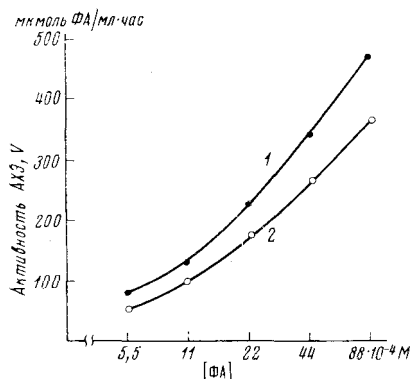


Рис. 2

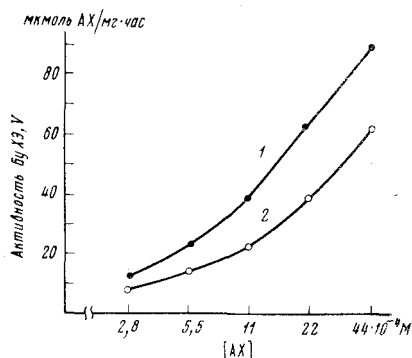


Рис. 3

Рис. 2. Влияние концентрации фенилацетата (ФА) на активность АХЭ эритроцитов человека. 1 — контроль (без добавления ФОИ), 2 — после инкубации с Гд-7 ( $5 \cdot 10^{-7} M$ ) в течение 1 мин.

Рис. 3. Влияние концентрации ацетилхолина на активность БУХЭ сыворотки крови лошади. Все обозначения как на рис. 2. Концентрация Гд-7  $2 \cdot 10^{-5} M$

битора. Если после инкубации эритроцитов с ФОИ произвести отмывание эритроцитов от ингибитора (кривая 2), то обнаруженный эффект исчезает, из чего можно заключить, что он связан с обратимым компонентом действия ФОИ. Не так давно обратимое действие ФОИ было обнаружено и исследовано совершенно другим путем (<sup>1, 15</sup>). Кривая 2 в общем параллельна кривой 1, но во всех точках расположена ниже нее. Это легко можно объяснить необратимым угнетением АХЭ под влиянием ФОИ, которое, как хорошо известно, связано с фосфорилированием гидроксила серинового остатка в активном центре фермента. Значительно труднее истолковать кривую 3, которая отражает обратимое действие ингибитора. Создается впечатление, что это действие направлено не на каталитический, а на регуляторный (аллостерический) центр фермента, причем именно на тот, который обеспечивает торможение АХЭ избытком ацетилхолина. В результате такого влияния выраженное торможение активности АХЭ наблюдается при более низкой концентрации субстрата, т. е. субстратное торможение усиливается. При увеличении концентрации ацетилхолина эффект исчезает, возможно благодаря конкуренции субстрата с ингибитором за связь с этим центром.

Непосредственная связь обнаруженного эффекта с явлением субстратного торможения была подтверждена в двух сериях опытов, в которых субстратное торможение было исключено двумя независимыми способами. В одном случае был использован субстрат, который на АХЭ не вызывает торможения при избыточной концентрации, — фенилацетат. В другом варианте опытов субстратом служил ацетилхолин, но в качестве фермента была использована БУХЭ, активность которой не подавляется избытком

этого субстрата. Условия опыта не отличались от тех, которые были приняты в основной серии. Результаты этих опытов представлены на рис. 2 и 3. Из рисунка ясно видно, что при отсутствии субстратного торможения (независимо от того, обусловлено это природой фермента или субстрата) наблюдаемый ранее эффект ФОИ отсутствует. В обоих случаях активность фермента равномерно повышалась с увеличением концентрации субстрата, а в присутствии ингибитора кривая активности была расположена ниже за счет необратимого торможения холинэстеразы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу того, что незаряженные соединения обладают способностью влиять на регуляторные (аллостерические) центры АХЭ. Это взаимодействие носит обратимый характер. Следует отметить, что в наших опытах впервые показано усиление субстратного торможения под влиянием аллостерического эффектора, тогда как все вещества, изученные в этом отношении до сих пор, вызывали в разной степени выраженное ослабление этого явления.

Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И. М. Сеченова  
Академии наук СССР  
Ленинград

Поступило  
21 X 1974

1-й Ленинградский медицинский институт  
им. И. П. Павлова

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Б. Долго-Сабуров, Э. К. Мухамеджанов, Укр. биохим. журн., т. 44, 400 (1972).  
<sup>2</sup> J. Gridelet, J. Foidart, P. Wins, Arch. Int. Physiol. Biochim., v. 78, 259 (1970). <sup>3</sup> J. P. Changeux, W. Leuzinger, M. Huchet, FEBS Lett., v. 2, 77 (1968). <sup>4</sup> W. N. Aldridge, E. Reiner, Biochem. J., v. 155, 147 (1969). <sup>5</sup> H. Wombacher, H. U. Wolf, Molec. Pharmacol., v. 7, 554 (1971). <sup>6</sup> B. Belleau et al., Molec. Pharmacol., v. 6, 41 (1970).  
<sup>7</sup> V. Mendel, H. Rudney, Science, v. 102, 616 (1945). <sup>8</sup> А. П. Бресткин и др., Биохимия, т. 35, 382 (1970). <sup>9</sup> B. D. Roufogalis, E. E. Quist, Molec. Pharmacol., v. 8, 41 (1972). <sup>10</sup> H. Kuhnen, Biochem. Pharmacol., v. 21, 1187 (1972). <sup>11</sup> L. Austin, W. K. Berry, Biochem. J., v. 54, 695 (1953). <sup>12</sup> Н. Н. Годовиков и др., Биохимия, т. 38, 616 (1973). <sup>13</sup> М. И. Кабачник и др., Усп. хим., т. 31, 1050 (1970). <sup>14</sup> S. Hestrin, J. Biol. Chem., v. 180, 249 (1949). <sup>15</sup> А. П. Бресткин и др., ДАН, т. 200, 103 (1971).