МЕТОДИ

УДК 577.151.35:577.152.311

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В РЕАКЦИЯХ ГИДРОЛИЗА ТИОНАФТИЛАЦЕТАТА

Ю. Г. ЖУКОВСКИЙ, Л. П. КУЗНЕЦОВА, Е. Е. СОЧИЛИНА, К. В. ВЕКСЛЕР

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия;
e-mail: esoch@esoch.mail.iephb.ru

Досліджено здатність холінестераз із різних біологічних джерел гідролізувати тіонафтилацетат. Проведено порівняльне визначення кінетичних параметрів V і K_m у реакціях гідролізу тіонафтилацетату та відомого субстрату ацетилтіохоліну за дії цих ферментів. Показано, що бутирилхолінестерази гідролізують тіонафтилацетат зі швидкістю, яку можна порівняти зі швидкістю гідролізу ацетилтіохоліну, в той саме час як ацетилхолінестерази та пропіонілхолінестерази гідролізують цей субстрат у декілька разів повільніше, ніж ацетилтіохолін. Значення K_m у реакціях гідролізу тіонафтилацетату за дії всіх вивчених холінестераз, за винятком холінестерази сироватки крові риби, на порядок вище, ніж для ацетилтіохоліну. Для останнього ферменту значення K_m для обох субстратів практично є рівними. Тіонафтилацетат може бути рекомендовано для фотоколориметричного визначення ферментативної активності бутилхолінестераз різного біологічного походження.

К л ю ч о в і с л о в а: ацетилхолінестераза, бутирилхолінестераза, пропіонілхолінестераза, ферментативний гідроліз, тіонафтилацетат, ацетилтіохолін, цетилпіридиніт.

Исследованию реакционной способности холинэстераз различного происхождения посвящено большое количество работ, и интерес к этим ферментам не ослабевает до настоящего времени. Среди многочисленных холинэстераз, обнаруженных практически во всех органах и тканях человека и животных, только для ацетилхолинэстеразы мозговой ткани выяснена ее физиологическая роль, состоящая в гидролизе ацетилхолина, выделяющегося в синаптическую щель при проведении нервного импульса. Функциональная роль большинства иных представителей семейства холинэстсраз, несмотря на множество предположений, до сих пор окончательно не установлена [1]. Многие холинэстеразы выделены из тканей с достаточно высокой степенью очистки и выпускаются как коммерческие препараты. К ним относятся ацетилхолинэстеразы электрической ткани электрических рыб, эритроцитов человека и быка, бутирилхолинэстераза сыворотки крови лошади, пропионилхолинэстераза из мозговой ткани и некоторые другие. Такие препараты используются в исследовательских целях и в качестве аналитических реагентов при определении антихолинэстеразных веществ.

Хотя отличительной особенностью холинэстераз является их способность с высокой скоростью гидролизовать холиновые эфиры карбоновых кислот, многие другие синтетические субстраты, характеризующиеся наличием сложноэфирной группировки, также гидролизуются этими ферментами с высокой скоростью. При работе с гомогенатами тканей, цельной кровью и другим биологическим материалом, содержащим холинэстеразу, целесообразно использовать специфические субстраты, такие как ацетилхолин, бутирилхолин. При работе с очищенными препаратами холинэстераз допустимо применение иных субстратов, зачастую обладающих особыми свойствами. Использование таких субстратов позволяет разрабатывать новые высокочувствительные методы определения холинэстеразной активности, а особенности их ферментативного гидролиза дают возможность расширять спектр применения холинэстераз для аналитических целей. Поиск и изучение новых синтетических субстратов, обладающих особыми свойствами, не теряет актуальности и остается перспективным направлением исследований. Особый интерес представляют серосодержащие субстраты, продуктами гидролиза которых являются тиоспирты. Последние, взаимодействуя с некоторыми хромогенными SH-реагентами, образуют окрашенные соедине-

ния и позволяют определять ферментативную активность простыми и надежными фотоколориметрическими методами.

Ранее нами было показано, что тионафтилацетат, являющийся тиоаналогом флуорогенного субстрата нафтилацетата, может быть использован для фотоколориметрического определения активности бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади [2]. Способность холинэстераз из других биологических источников гидролизовать этот субстрат не изучалась.

В настоящей работе проведено сравнительное исследование гидролиза тионафтилацетата и известного субстрата ацетилтиохолина под действием холинэстераз различного происхождения, и выявлен ряд особенностей ферментативного гидролиза тионафтилацетата в присутствии некоторых эффекторов.

Материалы и методы

В исследованиях использовали бутирилхолинэстеразу из сыворотки крови человека (БуХЭЧ; ацилхолинацилгидролаза, 3.1.1.8) с удельной активностью 7,0 U/мг белка, выделенную по методу [3], и бутирилхолинэстеразу из плазмы крови костистой рыбы синца *Abramis ballerus* (БуХЭР; ацилхолинацилгидролаза 3.1.1.8) с удельной активностью 8,1 U/мг белка, выделенную по методу [4]. За единицу фермента U принимали такое его количество, которое при pH 7,5 и температуре 25 °C в условиях потенциометрического анализа [1] гидролизует 1 мкмоль субстрата бутирилхолина за 1 мин. Кроме того, использовали коммерческие препараты ферментов Пермского НПО «Биомед»: ацетилхолинэстеразу (ацетилхолинацетилгидролаза, 3.1.1.7) из эритроцитов крови человека (АХЭЧ) и быка (АХЭБ) с удельной активностью 5,2 и 3,5 U на 1 мг массы соответственно; бутирилхолинэстеразу из сыворотки крови лошади (БуХЭЛ, ацилхолинацилгидролаза, 3.1.1.8) с удельной активностью 9,3 U на 1 мг массы; пропионилхолинэстеразу (ацилхолинацилгидролаза, 3.1.1.8) из мозговой ткани (ПХЭ-1) и из сыворотки крови (ПХЭ-2) с удельной активностью 57,0 и 1,6 U на 1 мг массы соответственно.

В качестве субстратов фермента использовали ацетилтиохолин йодид (АТХ, «Chemapol», Чехия) и 1-тионафтилацетат (ТНА), синтезированный по методу [5]. Исходный раствор тионафтилацетата готовили в этиловом спирте. Концентрация растворителя в конечной реакционной смеси не превышала 1% по объему и не оказывала влияния на скорость ферментативного гидролиза субстратов.

В качестве необратимого ингибитора холинэстераз применяли диизопропилфторфосфат (ДФФ; «Serva», Германия), в качестве эффектора для фермента – цетилпиридиний хлористый (ЦП, «Serva», Германия)

Кинетику ферментативного гидролиза субстратов исследовали при pH 7,5 и температуре 25 °C. Начальную скорость ферментативной реакции v определяли по скорости увеличения светопоглощения тионитробензойной кислоты, образующейся при взаимодействии продукта ферментативной реакции тиоспирта с 5,5′-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) в условиях, описанных ранее при работе с тиосубстратами [2]. Оптическую плотность реакционной смеси измеряли с помощью спектрофотометра “Specol-221” при длине волны 412 нм.

Величины кинетических параметров ферментативной реакции – максимальной скорости V и константы Михаэлиса K_m – находили графическим методом Лайнуивера–Берка [1] с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что все изученные холинэстеразы гидролизуют тионафтилацетат с образованием тиоспирта и уксусной кислоты. Неферментативный гидролиз этого субстрата протекает крайне медленно и вклад его в величину скорости ферментативного гидролиза при разных концентрациях субстрата не превышает 1%. Нами была изучена зависимость начальной скорости холинэстеразного гидролиза тионафтилацетата от его концентрации. Для сравнения в аналогичных условиях и при одинаковых концентрациях фермента и субстрата измерена скорость ферментативного гидролиза ацетилтиохолина как известного субстрата, хорошо гидролизуемого каждым из использованных ферментов.

Обработка экспериментальных данных показала, что зависимость начальной скорости v холинэстеразного гидролиза изученных субстратов от их концентраций в диапазоне $2\cdot10^{-5}$ – $5\cdot10^{-4}$ М подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен. Найденные для этого диапазона концентраций субстратов величины K_m и соотношения скорости гидролиза тионафтилацетата и ацетилтиохолина (в %) под действием одинаковых концентраций фермента для условий насыщения фермента субстратом ($V_{ТНА}/V_{АТХ}$) и при концентрации субстратов $5\cdot10^{-4}$ М ($v_{ТНА}/v_{АТХ}$) представлены в таблице.

Как видно из полученных данных, при малых концентрациях тионафтилацетат гидролизуется всеми изученными ферментами значительно медленнее, чем ацетилтиохолин. Скорость его

Величина K_m и соотношение скоростей гидролиза тионафтилацетата и ацетилтиохолина под действием различных холинэстераз ($M \pm m$, $n = 5-7$)

Фермент	K_m, 10^{-4} М		$(v_{ТНА}/v_{АТХ})\cdot100$, %	$(V_{ТНА}/V_{АТХ})\cdot100$, %	Влияние ЦП	
	ТНА	АТХ			ТНА	АТХ
БуХЭЧ	5,8 ± 0,3	0,36 ± 0,03	10,0 ± 1,2	76,6 ± 8,5	А	Т
БуХЭЛ	7,0 ± 0,5	1,00 ± 0,10	12,8 ± 1,5	74,7 ± 7,9	А	Т
БуХЭР	0,9 ± 0,1	0,77 ± 0,07	36,4 ± 3,9	40,0 ± 4,9	А	Т
ПХЭ-2	1,7 ± 0,1	0,20 ± 0,02	16,8 ± 1,9	34,0 ± 4,1	0	0
АХЭЧ	4,0 ± 0,2	0,40 ± 0,03	5,3 ± 0,8	31,0 ± 3,8	Т	Т
АХЭБ	3,8 ± 0,2	0,41 ± 0,03	5,1 ± 0,8	31,6 ± 3,9	Т	Т
ПХЭ-1	3,0 ± 0,2	0,33 ± 0,02	4,5 ± 0,6	20,0 ± 2,7	Т	Т

Условные обозначения: А – активация; Т – торможение; 0 – отсутствие эффекта. БуХЭЧ – бутирилхолинэстераза человека, БуХЭЛ – бутирилхолинэстераза лошади, БуХЭР – бутирилхолинэстераза рыбы, ПХЭ -2 – пропионилхолинэстераза сыворотки крови, АХЭЧ – ацетилхолинэстераза человека, АХЭБ – ацетилхолинэстераза быка, ПХЭ -1 – пропионилхолинэстераза из мозговой ткани. ТНА – 1-тионафтилацетат, АТХ – ацетилтиохолин йодид.

гидролиза под действием АХЭЧ, АХЭБ и ПХЭ-1 составляет не более 5% от скорости гидролиза ацетилтиохолина. Для менее специализированных сывороточных холинэстераз разница в скорости гидролиза субстратов несколько меньше. Для БуХЭЛ и БуХЭЧ эта величина составляет около 10%, для ПХЭ-2 – 16,8%, а БуХЭР в этих условиях гидролизует тионафтилацетат лишь в 2,7 раза медленее, чем ацетилтиохолин. При увеличении концентрации субстратов различия в скорости их гидролиза под действием сывороточных холинэстераз значительно уменьшаются. Так, максимальная скорость гидролиза тионафтилацетата ($V_{ТНА}$) в опытах с БуХЭЛ и БуХЕЧ составляет около 75% от соответствующих величин для ацетилтиохолина ($V_{АТХ}$). Для БуХЭР разница между величиной относительной скорости ферментативного гидролиза этих субстратов при малой и большой концентрациях субстратов ($v_{ТНА}/ v_{АТХ}$ – при концентрации субстрата $5\cdot10^{-4}$ М; $V_{ТНА}/ V_{АТХ}$ – при концентрации субстрата, насыщающей фермент) очень мала: 36,4 против 40,0%. Для эритроцитарных ацетилхолинэстераз (АХЭЧ и АХЭБ) и пропионилхолинэстеразы из нервной ткани (ПХЭ-1) также прослеживается уменьшение различий в скорости гидролиза тионафтилацетата и ацетилтиохолина при увеличении их концентрации, однако эта тенденция (повышение относительной величины скорости ферментативного гидролиза тионафтилацетата) менее выражена. У последних ферментов даже в условиях насыщения их субстратом проявляется выраженная избирательность легче гидролизовать ацетилтиохолин, чем гидролизовать тионафтилацетат. Так, величины максимальной скорости гидролиза тионафтилацетата и ацетилтиохолина для АХЭЧ и АХЭБ различаются почти в три, а для ПХЭ-1 – в четыре раза в пользу ацетилтиохолина. Величина K_m в реакциях гидролиза тионафтилацетата на порядок выше, чем для ацетилтиохолина во всех случаях, кроме БуХЭР. Для этого фермента величины K_m в реакциях гидролиза обоих субстратов почти совпадают.

Известно, что тионафтилацетат хорошо гидролизуется алиэстеразами, что обуславливает его применение в гистохимии [2]. Используемые в экспериментах частично очищенные препараты холинэстераз могут содержать примесные эстеразы, также способные гидролизовать этот субстрат. Ранее было установлено [1], что неспецифические примесные эстеразы по сравнению с холинэстеразами, как правило, менее чувствительны к фосфорорганическим ингибиторам. Для определения доли гидролиза тионафтилацетата, приходящейся на примесные эстеразы, мы провели измерение скорости его гидролиза до и после инкубации препарата фермента с необратимым высокоизбирательным ингибитором холинэстераз –диизопропилфторфосфатом (ДФФ). Минимальную рабочую концентрацию ДФФ подбирали с таким расчетом, чтобы остаточная активность ферментного препарата, определенная по ацетилтиохолину, равнялась нулю. Измерения показали, что доля неспецифических эстераз составляет 1–2% для бутирилхолинэстераз, не более 1,5% для ПХЭ-1, 2% для ацетилхолинэстераз и около 5% для ПХЭ-2. Приведенные данные свидетельствуют о том, что в коммерческих и очищенных нами препаратах холинэстераз примесные эстеразы присутствуют в незначительных количествах и их влияние на скорость ферментативного гидролиза тионафтилацетата не

существенно. Но следует иметь в виду, что при определении с помощью этого субстрата ферментативной активности неочищенных или малоочищенных препаратов: цельной плазмы крови, гомогенатов биологических тканей и др., могут быть получены ошибочные (завышенные) величины.

Ранее нами было показано, что скорость гидролиза тионафтилацетата в реакциях с БуХЭЛ существенно возрастает в присутствии эффекторов из ряда азотсодержащих катионных детергентов с протяженным алкильным радикалом, а на аналогичный гидролиз ацетилтиохолина эти соединения действуют как обратимые ингибиторы [2]. Подобный эффект наблюдался нами ранее и для флуорогенного субстрата нафтилацетата [6]. В таблице указан характер влияния (активация – А, торможение – Т, отсутствие эффекта – 0) катионного детергента цетилпиридиния в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М на гидролиз тионафтилацетата и ацетилтиохолина под действием холинэстераз различного происхождения. Из этих данных следует, что добавление цетилпиридиния уменьшает скорость ферментативного гидролиза ацетилтиохолина для всех изученных ферментов, кроме ПХЭ-2, тогда как его влияние на скорость ферментативного гидролиза тионафтилацетата существенно зависит от природы холинэстеразы. Так, цетилпиридиний увеличивает реакционную способность всех трех бутирилхолинэстераз по отношению к тионафтилацетату, с наименьшим эффектом для БуХЭР (лишь в 1,5 раза). По отношению к ацетилхолинэстеразам этот эффектор ведет себя как обычный обратимый ингибитор. Подобным образом он влияет и на ПХЭ-1 из мозговой ткани, по многим свойствам близкую к ацетилхолинэстеразам [1]. На ПХЭ-2 цетилпиридиний в концентрации, использованной в эксперименте, практически не оказывает действия, что согласуется с данными об очень низкой чувствительности этого фермента к алкиламмонийным ионам [1].

Таким образом, в наших экспериментах показано, что тионафтилацетат гидролизуется холинэстеразами из различных биологических источников и может быть использован для определения активности частично очищенных и коммерческих препаратов ферментов фотоколориметрическим методом. При этом скорость его гидролиза под действием бутирилхолинэстераз, наиболее широко используемых в аналитических целях, сопоставима со скоростью гидролиза известного субстрата ацетилтиохолина.

Тионафтилацетат обладает теми же кинетическими особенностями взаимодействия с холинэстеразами в присутствии некоторых катионных детергентов, что и изученный ранее флуорогенный субстрат нафтилацетат. Замена нафтилацетата на тионафтилацетат в предложенных ранее методиках [7] количественного определения антихолинэстеразных соединений позволит значительно упростить аналитическую процедуру определения этих веществ, являющихся распространенными загрязнителями окружающей среды.

Применение тионафтилацетата в кинетических исследованиях создает возможность выявлять новые особенности сывороточных и эритроцитарных холинэстераз, что расширяет наши представления о сходстве и различии этих ферментов, и таким образом обеспечивает условия для получения дополнительных сведений по сравнительной энзимологии.

COMPARATIVE RESEARCH OF ENZYMATIC ACTIVITY OF CHOLINE ESTERASES OF DIFFERENT ORIGIN IN THIONAPHTHYLACETATE HYDROLYSIS REACTIONS

Yu. G. Zhukovsky, L. P. Kuznetsova, E. E. Sochilina, K. V. Veksler

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Sanct-Petersbourg, Russia;
e-mail: esoch@esoch.mail.iephb.ru

S u m m a r y

A comparative determination of kinetic parameters V and K_m in the reaction of hydrolysis thionaphthylacetate and well known substrate acetylthiocholine by choline esterases from different sources was conducted. It is shown that butyrylcholine esterases hydrolyze thionaphthylacetate with velocity comparable with that of hydrolysis of acetylthiocholine, while acetylcholine esterases and propionylcholine esterases hydrolyze this substrate several times slower than acetylthiocholine. The values of K_m in the reactions of hydrolysis of thionaphthylacetate for all studied cholynesterases is an order higher than for acetylthiocholine except cholinesterase of blood serum of fish. This value for the latter enzyme is practically equal.

K e y w o r d s: acetylcholine esterase, butyrylcholine esterase, enzyme hydrolyse, thionaphthylacetate, acetylthiocholine, cetylpyridinium.

1. *Бресткин А. П., Кузнецова Л. П., Моралев С. Н. и др.* Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. Владивосток: ТИНРО. 1997. 466 с.
2. *Жуковский Ю. Г., Кузнецова Л. П., Сочилина Е. Е.* // Укр. біохім. журн. 2003. **75**, № 3. С. 67–70.

3. *Жуковский Ю. Г., Кузнецова Л. П., Сочилина Е. Е., Алебян Г. П.* //Журн. эвол. биохим. и физиол. 1997. **33**, № 3. С. 308–312.
4. *Жуковский Ю. Г., Кузнецова Л. П., Сочилина Е. Е. и др.* // Там же. 1996. **32**, № 2. С. 212–216.
5. *Oae S., Aida T., Furukawa N.* // Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1975. **23**, N 11. P. 3011–3016.
6. *Жуковский Ю. Г., Кузнецова Л. П., Сочилина Е. Е.* // Укр. біохім. журн. 1995. **67**, № 4. С. 40–46.
7. *Жуковский Ю. Г., Кузнецова Л. П., Сочилина Е. Е.* // Там само. 2002. **74**, № 2. С. 140–143.

Получено 12.05.2004