

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ  
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱՎԱԴԵՍԻԱ  
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ  
АРМЕНИЯ

Հայաստանի քիմիական հանդես 62, №1-2, 2009 Химический журнал Армении

УДК 577.15.004.14 + 577.15 + 577.151.02

КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГИДРОЛИЗА ДИХОЛИНОВОГО ЭФИРА СЕ-  
БАЦИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ  
СЫВОРОТОЧНОЙ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

М. Р. МНАЦАКАНЯН<sup>1</sup>, А. О. ПАПОЯН<sup>1</sup>, В. А. САМОКИШ<sup>2</sup> и Г. П. АЛЕБЯН<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт биотехнологии  
Армения, Ереван, 0056, ул. Гюрджяна 14  
E-mail: ghukashalebyan@yahoo.com

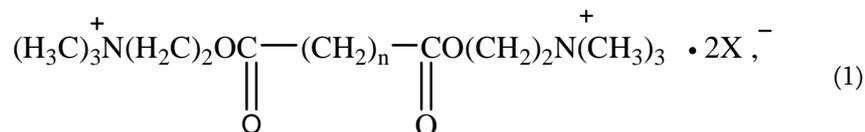
<sup>2</sup> Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург  
E-mail: sam43@mail.ru

Поступило 2 IV 2009

Приведены новые кинетические данные, подтверждающие факт нарушения чисто конкурентных отношений между дихолиновым эфиром себаценовой кислоты (ДХЭ) и монохолиновым эфиром себаценовой кислоты (МХЭ) при ферментативном гидролизе ДХЭ, под действием бутирилхолинэстеразы сыворотки крови человека (БХЭ). Параметры уравнения Михаэлиса-Мэнтен для ДХЭ и МХЭ определены с использованием индивидуальных веществ. Показано, что по сравнению с сукцинилдихолином и сукцинилмонохолином, для которых  $K_{m(ДХЭ)} / K_{m(МХЭ)} \approx 10^2$  и  $\sim V_{max(ДХЭ)} / V_{max(МХЭ)} \approx 7$ , кинетические параметры для ДХЭ ( $K_{m(ДХЭ)} = (3.0 \pm 0.38) \times 10^{-5}$  М,  $k_{cat(ДХЭ)} = (16.4 \pm 0.14) \times 10^3$  мин<sup>-1</sup>) и для МХЭ ( $K_{m(МХЭ)} = (2.2 \pm 0.28) \times 10^{-4}$  М,  $k_{cat(МХЭ)} = (6.09 \pm 0.91) \times 10^3$  мин<sup>-1</sup>) значительно ближе и их соотношения соответственно составляют  $K_{m(ДХЭ)} / K_{m(МХЭ)} \approx 0.14$  и  $\sim V_{max(ДХЭ)} / V_{max(МХЭ)} \approx 2.7$ . Экспериментально определенные кинетические параметры для ДХЭ и МХЭ использованы для построения теоретических зависимостей изменения концентраций реагирующих веществ (исходных веществ и продуктов) от времени. Анализ полученных результатов свидетельствует, что индивидуальные параметры уравнения Михаэлиса-Мэнтен для ДХЭ и МХЭ при условии отсутствия отклонений от чисто конкурентного механизма не позволяют объяснить накопление обнаруженной концентрации себаценовой кислоты в реакционной среде ( $1.7 \times 10^{-4}$  М при исходной концентрации ДХЭ  $5 \times 10^{-4}$  М) на первой стадии ферментативного гидролиза ДХЭ. Предложенная нами схема, объясняющая наблюдаемое явление отклонения от конкурентности, основана на предположении, что часть молекул МХЭ, образующаяся в результате гидролиза ДХЭ, "успекает" гидролизироваться из-за её замедленной диффузии в реакционную среду из области активного центра фермента.

Рис. 6, библиограф. ссылок 18.

Дихолиновые эфиры алифатических дикарбоновых кислот (ДХЭ) с общей формулой (1) являются биологически активными веществами. Они обладают избирательным действием на холинорецепторы (ХР) скелетных мышц, вызывая блок нервно-мышечной проводимости. Благодаря сравнительно низкой цене и доступности сукцинилдихолин (дителин) (n=2) как миорелаксант короткого действия является препаратом выбора при интубации трахеи и широко применяется в медицинской практике [1-4].

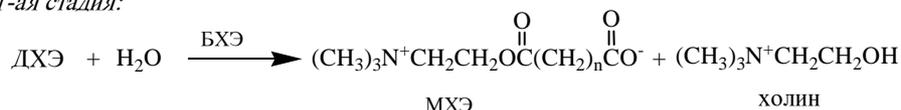


где X=Hal

Одной из важных фармакологических характеристик дителина и других ДХЭ является кратковременность их действия на организм, что обусловлено быстрым ферментативным гидролизом ДХЭ под действием бутирилхолинэстеразы сыворотки крови (БХЭ, НФ 3.1.1.8) [5].

В работах [6-9] показано, что ферментативный гидролиз под действием БХЭ протекает в две последовательные стадии (схема 1). Сначала протекает гидролиз одной из сложноэфирных связей с образованием монохолинового эфира (МХЭ) и холина, далее расщепляется МХЭ, образуя дикарбоновую кислоту (ДК) и холин. Благодаря большой разнице в значениях  $K_m$  ДХЭ ( $K_{m(\text{ДХЭ})}$ ) и МХЭ ( $K_{m(\text{МХЭ})}$ ) вторая стадия ферментативного гидролиза начинается только после практически полного исчерпания в реакционной среде ДХЭ [10], и следовательно, ДК начинает накапливаться в реакционной среде только после исчерпания ДХЭ. Показано также, что максимальная скорость ( $V_{max}$ ) ферментативного гидролиза МХЭ значительно ниже  $V_{max}$  ДХЭ той же кислоты. При этом разница в значениях кинетических параметров с удлинением полиметиленовой цепи в молекуле ДК постепенно уменьшается.

1-ая стадия:



2-ая стадия:

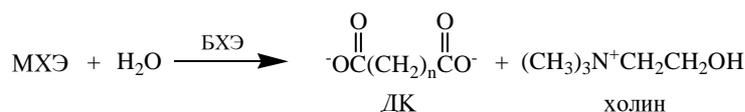


Схема 1. Двухстадийный ферментативный гидролиз ДХЭ под действием БХЭ

Нами было показано, что кинетика ферментативного гидролиза ДХЭ (n≥6) под действием БХЭ плазмы крови человека демонстрирует отклонение от описанной выше схемы. Суть отклонения – накопление в реакционной среде дикарбоновой кислоты на первой ста-

дии гидролиза [11]. Для объяснения наблюдаемого явления нами было предположено, что значительная часть молекул МХЭ<sub>8</sub>, образующихся в результате гидролиза ДХЭ<sub>8</sub>, успевает гидролизироваться на том же активном центре с образованием дикарбоновой кислоты, а другая часть их диффундирует в реакционную среду [11] (схема 2).

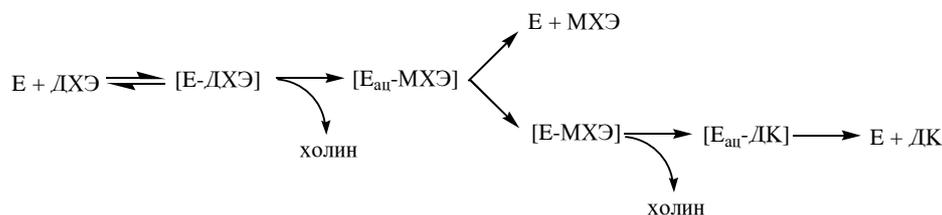


Схема 2. Возможный механизм первой стадии ферментативного гидролиза дихолиновых эфиров высших дикарбоновых кислот (для  $n \geq 6$ ) под действием БХЭ. E – фермент.

Однако обнаруженное отклонение может иметь и более простое объяснение. Параметры уравнения Михаэлиса-Мэнтен ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) для ДХЭ и МХЭ высших дикарбоновых кислот не так сильно отличаются, как, например, для дитилина, для которого, согласно литературным данным,  $-K_m(ДХЭ) / K_m(МХЭ) \sim 10^{-2}$  и  $V_{max}(ДХЭ) / V_{max}(МХЭ)$  (7 при гидролизе под действием БХЭ человека (БХЭ<sub>ч</sub>) [12] и  $\sim 10^{-3}$  и (15 под действием БХЭ лошади (БХЭ<sub>л</sub>) [13]. В течение гидролиза ДХЭ параллельно может протекать конкурирующая реакция с молекулами МХЭ из раствора.

Цель данной работы – детальное исследование кинетики гидролиза ДХЭ и МХЭ себациновой кислоты (ДХЭ<sub>8</sub> и МХЭ<sub>8</sub>) под действием БХЭ<sub>ч</sub> и БХЭ<sub>л</sub> и определение механизма, приводящего к накоплению ДК на первой стадии ферментативного гидролиза ДХЭ<sub>8</sub>.

## Экспериментальная часть

Скорость ферментативного гидролиза ДХЭ<sub>8</sub> определяли методом прямого потенциометрического титрования образующихся при гидролизе кислотных продуктов в реакционной среде, содержащей 0.3 М КСl и 0.001 М фосфатного буфера на приборе pH-stat марки «Radiometer Analytical TitraLab854». Определения проводились в термостатируемой ячейке прибора при  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$  и pH 7.6. Минимальная начальная концентрация субстратов в реакционной среде составляла  $2.5 \cdot 10^{-4}$  М, а в качестве титранта использовали 0.015-0.02 М раствор NaOH.

Использованный препарат БХЭ<sub>ч</sub> высокой степени очистки из сыворотки крови человека с удельной активностью 344 U/mg любезно предоставлен профессором О. Локридж (UNMC, Eppley Institute for Cancer Research, Omaha, NE, USA).

Синтез йодметилатов ди- и метиламиноэтиловых эфиров себациновой кислоты (ДХЭ<sub>8</sub> и МХЭ<sub>8</sub>) проведен согласно работам [1, 8].

## Обсуждение результатов

**Кинетика полного ферментативного гидролиза ДХЭ<sub>8</sub>.** На рис. 1 показана зависимость накопления “кислотного продукта” (рассчитанная исходя из расхода количества титранта – NaOH) в течение реакции холинэстеразного гидролиза ДХЭ<sub>8</sub> от времени. Здесь и далее при описании аналогичных кривых под “кислотным продуктом” подразумеваются как МХЭ, так и ДК, кислотные группы которых при данных значениях рН титруются одинаково и, следовательно, неразличимы. Согласно полученной кривой, на которой имеется выраженный излом, реакция протекает в две стадии, что в общих чертах согласуется с наблюдаемой картиной, характерной для сукцинилдихолина и других членов ряда [10]. Сначала накопление кислотного продукта в реакционной среде происходит монотонно, практически с постоянной скоростью. Линейное нарастание концентрации продукта наблюдается до накопления определенного количества продукта, равного  $\sim 6.7 \times 10^{-4}$  М, при достижении которого кинетика реакции меняется, что выражается в резком снижении скорости реакции гидролиза и отклонении зависимости от линейной. Далее скорость реакции монотонно убывает и по достижении кислотного продукта (ДК<sub>8</sub>), равного ожидаемому теоретическому количеству (два эквивалента на 1М ДХЭ<sub>8</sub>), она приближается к нулю.

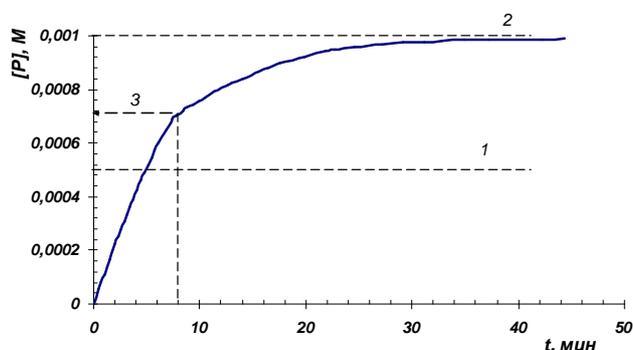


Рис. 1. Зависимость накопления кислотного продукта в реакции ферментативного гидролиза субстрата ДХЭ<sub>8</sub> под действием БХЭ от времени. Пунктирными линиями 1 и 2 указано ожидаемое количество кислотного продукта (согласно литературным данным) в конце первой и второй стадий реакции, а пунктирной линией 3 – наблюдаемое в эксперименте количество кислотного продукта в конце первой стадии.  $[ДХЭ_8] = 5 \cdot 10^{-4}$  М.

Таким образом, общая картина кинетического поведения гидролиза ДХЭ<sub>8</sub> соответствует описанному в литературе гидролизу ДХЭ<sub>7</sub>. Однако ожидаемая концентрация кислотного продукта в конце первой стадии ферментативного гидролиза, вместо  $5 \cdot 10^{-4}$  М, как показано для сукцинилдихолина и некоторых других членов ряда (БХЭч, БХЭл) [8, 10, 13], равна  $\sim 7 \times 10^{-4}$  М.

**Определение  $K_m$  и  $V_{max}$  ДХЭ<sub>8</sub>.** Определение параметров уравнения Михаэлиса-Мэнтен для ДХЭ<sub>8</sub> проводилось методом измерения начальных скоростей. Концентрационный интервал субстрата  $2.5 \times 10^{-5} \div 5 \div 10^{-3}$  М подбирался исходя из литературных данных [12], согласно которым,  $K_m(ДХЭ_2)$  равна  $4.2 \times 10^{-5}$  М. При этом использованное нами сравнительно высокое

значение нижнего предела концентрации ДХЭ<sub>8</sub> –  $2.5 \cdot 10^{-5}$  М обусловлено буферной емкостью реакционной среды и ограниченной чувствительностью потенциметрического метода.

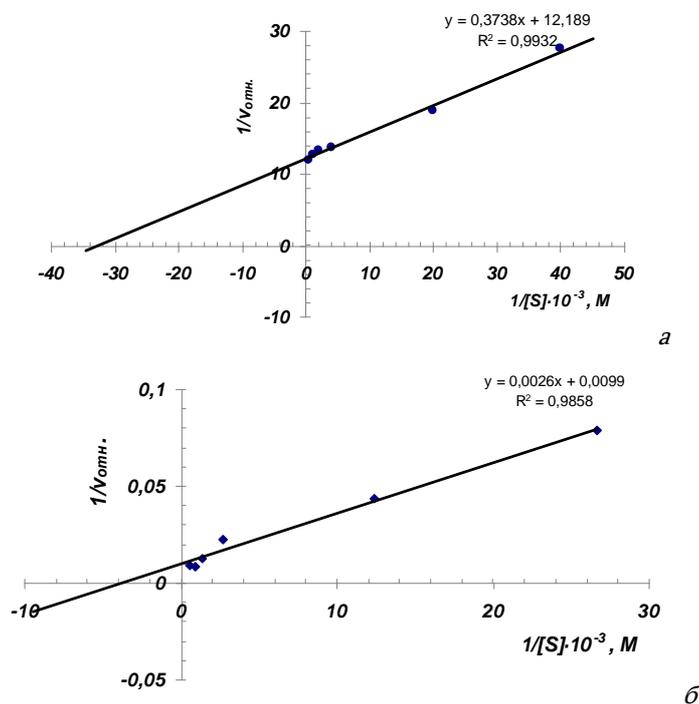


Рис. 2. График Лайнуивера – Бэрка для реакций гидролиза под действием БХЭч ДХЭ<sub>8</sub> (а) и МХЭ<sub>8</sub> (б).

Результаты проведенных измерений приведены на рис. 2а, из которого видно, что в координатах Лайнуивера-Бэрка наблюдается хорошая линейная зависимость (величина достоверности аппроксимации –  $R^2=0.99$ ), а значение  $K_m(\text{ДХЭ}_8)$  равно  $(3.0 \pm 0.38) \times 10^{-5}$  М. Таким образом, полученное значение константы Михаэлиса для ДХЭ<sub>8</sub>, практически совпадает со значением  $K_m(\text{ДХЭ}_2)$ .

**Определение  $K_m$  и  $V_{\text{max}}$  МХЭ<sub>8</sub>.** Определение параметров уравнения Михаэлиса-Мэнтен для МХЭ<sub>8</sub> проводили как методом измерения начальных скоростей, так и исходя из кинетической кривой полного гидролиза субстрата. И в этом случае при выборе концентрационного интервала субстрата  $3.75 \times 10^{-4}$  М ч  $2 \times 10^{-3}$  М исходили из литературных данных [12], согласно которым, значение  $K_m(\text{МХЭ}_2)$  равно  $8.4 \times 10^{-3}$  М. Как видно из рис. 2б, в координатах Лайнуивера-Бэрка для МХЭ<sub>8</sub> также наблюдается хорошая линейная зависимость ( $R^2 = 0.98$ ), а значение  $K_m(\text{МХЭ}_8)$  равно  $(2.2 \cdot 0.28) \times 10^{-4}$  М. Таким образом, полученное значение константы Михаэлиса для МХЭ<sub>8</sub>, значительно отличается от  $K_m(\text{МХЭ}_2)$ .

Для повышения достоверности полученного значения  $K_m(\text{МХЭ}_8)$  нами проведено ее определение из кинетической кривой полного гидролиза субстрата при начальной концентрации  $3.75 \times 10^{-4}$  М (рис. 3), что соответствует нижнему пределу в предыдущей серии опытов. Как

показано на рисунке, накопление кислотного продукта при ферментативном гидролизе МХЭв, проведенном в аналогичных с ДХЭв условиях, происходит по кривой, характерной для концентраций субстрата, близких к значению  $K_m$ . На рис. 4 полученные результаты приведены в виде графика в координатах Лайнуивера-Бэрка, где  $V$  и  $[S]$  являются текущими значениями скорости реакции и соответствующей ей концентрации. Как видно из приведенных данных, и в этом случае наблюдается хорошая линейная зависимость ( $R^2=0.999$ ), а значение  $K_{m(МХЭв)}$  равно  $(2.02 \pm 0.26) \times 10^{-4}$  М, что практически не отличается от значения, полученного методом начальных скоростей. Таким образом, полученные результаты показывают, что гидролиз МХЭв подчиняется кинетике Михаэлиса в широком концентрационном интервале.

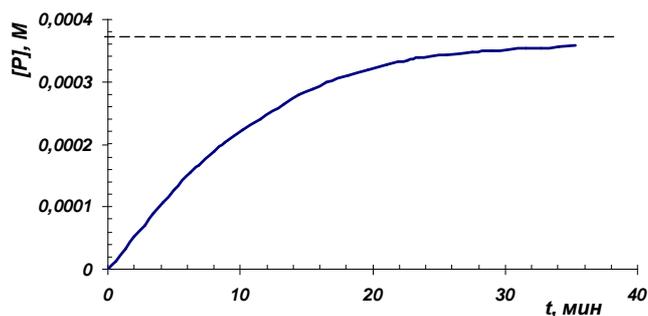


Рис. 3. Зависимость накопления кислотного продукта гидролиза субстрата МХЭв от времени. Пунктирной линией указано ожидаемое количество дикислоты.

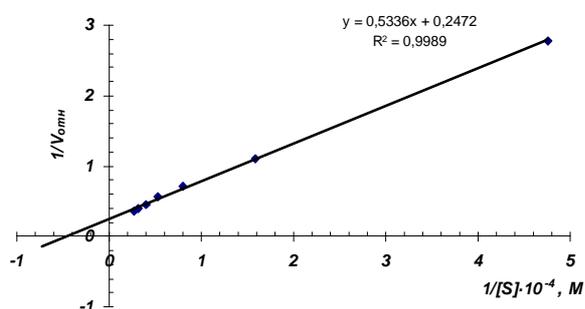


Рис. 4. График Лайнуивера – Бэрка для реакций гидролиза МХЭв под действием БХЭч (из кинетической кривой полного гидролиза субстрата (МХЭв)).

**Влияние холина на гидролиз ДХЭв и МХЭв.** Как указано в литературе, холин, который является продуктом реакции гидролиза холиновых эфиров, может выступать в роли обратимого ингибитора [14, 15]. Вероятно, данное явление может иметь место также в реакции гидролиза МХЭв. Однако необходимо учитывать, что ингибирующее действие холина может оказаться значимым только в тех случаях, если значение константы ингибирования (холина)

сравнимо или меньше константы Михаэлиса субстрата. Специальные опыты с добавлением холина в реакционную систему (МХЭ<sub>8</sub>+БХЭ<sub>4</sub>) в концентрациях, вдвое превышающих концентрацию МХЭ<sub>8</sub>, показали, что начальная скорость реакции остается практически неизменной. Слабое торможение, т. е. падение начальной скорости на ~34%, наблюдается при концентрации холина, в двадцать раз превышающей концентрацию МХЭ<sub>8</sub>. На основании результатов данных экспериментов нами рассчитана константа ингибирования холина. Для расчета значения константы ингибирования холина исходили из предположения о конкурентном типе ингибирования реакции гидролиза МХЭ<sub>8</sub> и соответственно использовали известное уравнение (2):

$$V_{(MXЭ)} = \frac{V_{max(MXЭ)}}{1 + \frac{K_m(MXЭ)}{[MXЭ]} \left( 1 + \frac{[холин]}{K_i} \right)}, \quad (2)$$

где  $V$  – наблюдаемая начальная скорость реакции гидролиза МХЭ<sub>8</sub> в присутствии холина,  $K_i$  – константа ингибирования холина,  $[холин]$  – концентрация холина в реакционной смеси. Определенное нами значение константы ингибирования холина равно  $4.7 \times 10^{-3}$  М, что хорошо согласуется с литературным данным, где значение константы ингибирования холина в реакции гидролиза бутирилтиохолина под действием БХЭ<sub>4</sub> при 37 (С равно  $(11.004 \pm 0.766) \times 10^{-3}$  М [16].

Таким образом, значение константы ингибирования холина приблизительно в двадцать раз превышает значение  $K_m(MXЭ)$ , и больше чем в сто сорок раз значение  $K_m(DXЭ)$ , и, следовательно, при гидролизе ДХЭ<sub>8</sub> и МХЭ<sub>8</sub> ингибирующим действием холина можно пренебречь.

**Расчетные кривые двухстадийного ферментативного гидролиза ДХЭ<sub>8</sub>.** На основе описанных выше экспериментов можно констатировать, что значение  $K_m(DXЭ)$  равно  $(3.33 \pm 0.38) \times 10^{-5}$  М; значение  $K_m(MXЭ)$  равно  $(2.2 \pm 0.28) \times 10^{-4}$  М и в 6.1 раза больше значения  $K_m(DXЭ)$ ; соотношение  $V_{max(DXЭ)}/V_{max(MXЭ)}$  равно 2.7; значение  $K_i$  для холина равно  $4.7 \times 10^{-3}$  М.

Экспериментально определенные параметры уравнения Михаэлиса-Мэнтен для ДХЭ<sub>8</sub> и МХЭ<sub>8</sub> нами использованы для построения теоретических зависимостей изменения концентраций реагирующих веществ от времени. При этом сделаны два допущения: отсутствие нарушения конкурентности между ДХЭ<sub>8</sub> и МХЭ<sub>8</sub> (схема 3), и отсутствие влияния холина на реакцию ферментативного гидролиза субстратов.

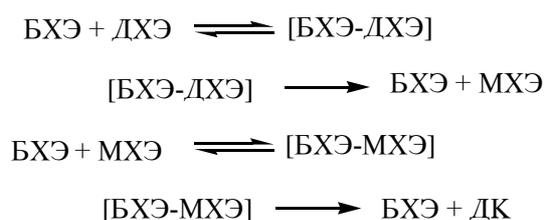


Схема 3. Последовательная реакция гидролиза ДХЭ под действием БХЭ.

Учитывая сделанные предположения для проведения расчетов, использованы известные уравнения (3-5), описывающие зависимость скорости реакций от концентраций двух конкурирующих субстратов [17].

$$V = V_{(MXЭ)} + V_{(ДХЭ)} = \frac{V_{max(MXЭ)} \frac{[MXЭ]}{K_m(MXЭ)} + V_{max(ДХЭ)} \frac{[ДХЭ]}{K_m(ДХЭ)}}{1 + \frac{[MXЭ]}{K_m(MXЭ)} + \frac{[ДХЭ]}{K_m(ДХЭ)}}, \quad (3)$$

$$V_{(MXЭ)} = \frac{V_{max(MXЭ)}}{1 + \frac{K_m(MXЭ)}{[MXЭ]} \left( 1 + \frac{[ДХЭ]}{K_m(ДХЭ)} \right)}, \quad (4)$$

$$V_{(ДХЭ)} = \frac{V_{max(ДХЭ)}}{1 + \frac{K_m(ДХЭ)}{[ДХЭ]} \left( 1 + \frac{[MXЭ]}{K_m(MXЭ)} \right)}, \quad (5)$$

где  $V$  – начальная скорость суммарной реакции для смеси, содержащей МХЭ<sub>8</sub> и ДХЭ<sub>8</sub>;  $V_{(MXЭ)}$  и  $V_{(ДХЭ)}$  – скорости превращений МХЭ и ДХЭ в реакционной смеси субстратов, которые выражаются уравнениями (4) и (5), соответственно;  $K_m(MXЭ)$  и  $K_m(ДХЭ)$  – константы Михаэлиса;  $V_{max(ДХЭ)}$  и  $V_{max(MXЭ)}$  – максимальные скорости реакций гидролиза;  $[MXЭ]$  и  $[ДХЭ]$  – концентрации МХЭ<sub>8</sub> и ДХЭ<sub>8</sub>, соответственно.

Для получения доступной проверки зависимости концентрации продукта  $[P]$  от времени  $t$  применен численный метод. Расчет значений  $[P]$  проведен с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003. Для получения кривой  $[P] = f(t)$  взяты промежутки времени  $\Delta t = const$ , а их число составляло не менее 50 точек.

Как видно из рис.5, на теоретической кривой также присутствует четкое разделение двух стадий. Хотя общая кинетическая картина аналогична полученной экспериментальной кривой (рис.1), в этом случае резкое снижение скорости накопления кислотного продукта наблюдается при количестве, приблизительно равном  $\sim 5.4 \times 10^{-4}$  М.

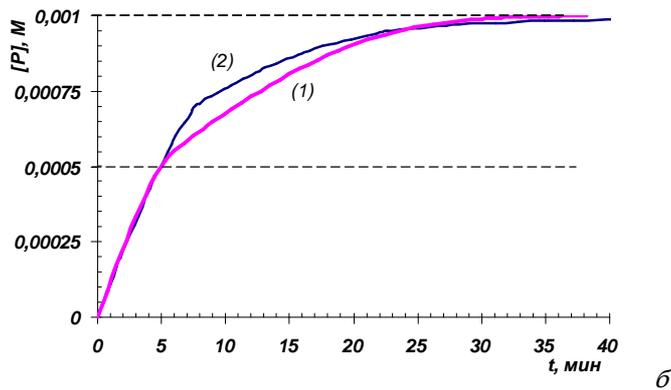
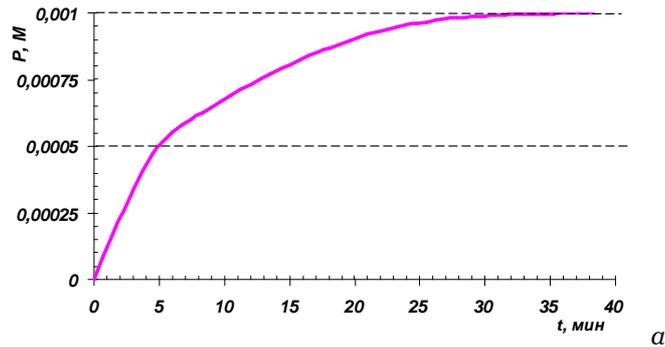


Рис. 5. а. Теоретическая кривая накопления кислотного продукта от времени при ферментативном гидролизе ДХЭ (при условии соблюдения чисто конкурентных отношений между субстратами ДХЭ<sub>8</sub> и МХЭ<sub>8</sub>). б. Наложение теоретической (1) и экспериментальной (2) кривых накопления кислотного продукта от времени при полном (по двум сложноэфирным связям) ферментативном гидролизе ДХЭ<sub>8</sub>.

Наложение теоретической и экспериментальной кривых накопления кислотного продукта от времени при полном (по двум сложноэфирным связям) ферментативном гидролизе ДХЭ<sub>8</sub> показано на рис. 5а, из которого видно, что до накопления кислотного продукта в реакционной среде  $\sim 5.4 \times 10^{-4}$  М теоретическая кривая вполне удовлетворительно воспроизводит экспериментальную. Однако, начиная с указанной концентрации продукта, теоретическая кривая резко отклоняется от экспериментальной. На рис. 6 приведены теоретически рассчитанные кривые ( $[ДХЭ_8] = f(t)$ ,  $[МХЭ_8] = f(t)$ ,  $[ДК_8] = f(t)$ ,  $[холин] = f(t)$ ), откуда видно, что в точке, соответствующей излому на кривой  $[P] = f(t)$  (рис. 5а и 5б), максимальная концентрация накапливаемой в реакционной среде МХЭ<sub>8</sub> равна  $\sim 4.6 \times 10^{-4}$  М, а соответствующее значение концентрации ДК соответственно равно  $\sim 0.57 \times 10^{-4}$  М. Проведенные расчеты, направленные на смещение излома на теоретической кривой в сторону более высоких значений концентрации продукта, приводят к таким значениям параметров уравнения Михаэлиса-Мэнтен для

ДХЭ<sub>8</sub> и МХЭ<sub>8</sub>, которые, по крайней мере, отличаются от экспериментально определенных более чем на 200%.

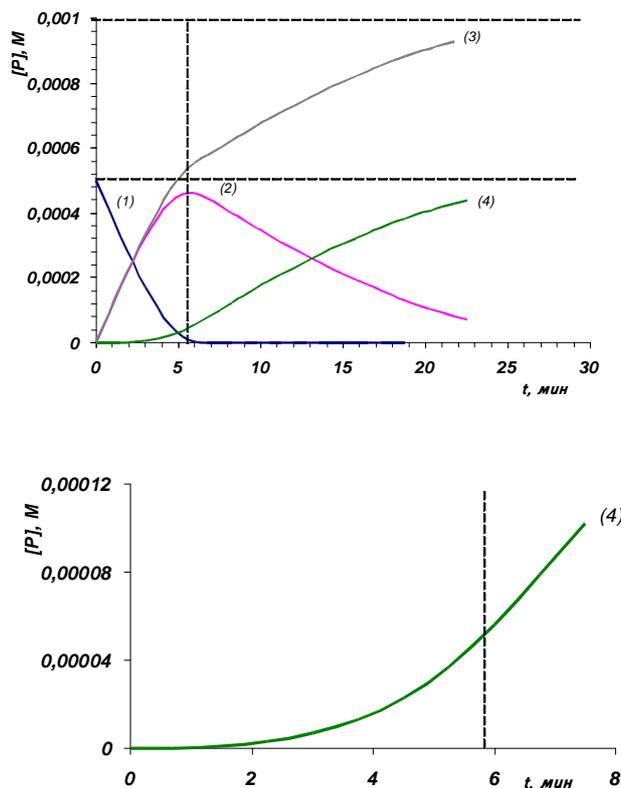


Рис. 6. Теоретически рассчитанные кривые зависимости концентраций субстрата и продуктов реакции от времени при ферментативном гидролизе ДХЭ (при условии соблюдения чисто конкурентных отношений между субстратами ДХЭ<sub>8</sub> и МХЭ<sub>8</sub>): (1) – [ДХЭ<sub>8</sub>], (2) – [МХЭ<sub>8</sub>], (3) – [холин], (4) – [ДК<sub>8</sub>].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что индивидуальные параметры уравнения Михаэлиса-Мэнтен для ДХЭ<sub>8</sub> и МХЭ<sub>8</sub>, при условии отсутствия отклонений от чисто конкурентного механизма, не могут объяснить накопление в реакционной среде ДК<sub>8</sub> в концентрации  $1.7 \times 10^{-4}$  М на первой стадии ферментативного гидролиза ДХЭ<sub>8</sub>. Следовательно, вероятнее всего, накопление ДК<sub>8</sub> в течение первой стадии гидролиза ДХЭ<sub>8</sub> протекает параллельно по двум, обсуждаемым выше, механизмам (схемы 2 и 3).

Ранее нами совместно с французскими коллегами проведено масс-спектрометрическое исследование кинетики ферментативного гидролиза ДХЭ<sub>8</sub> под действием БХЭ<sub>ч</sub> [18]. С применением метода, позволяющего определение кинетики по всем компонентам реакционной системы, также показано образование ДК<sub>8</sub> в течение первой стадии гидролиза ДХЭ<sub>8</sub>. При этом наблюдаемая кинетика накопления ДК<sub>8</sub> на первой стадии имеет практически линейный характер и этим отличается от кинетики, присущей для чисто конкурентных отношений между субстратами (рис. 6, кр. 4).

В заключение отметим, что согласно полученными нами предварительным данным, при исследовании гидролиза ДХЭ<sub>8</sub> под действием БХЭ<sub>7</sub> роль образования ДК<sub>8</sub> в течение первой стадии гидролиза по чисто конкурентному механизму незначительно мала.

**ԱՐՅԱՆ ՇԻՃՈՒԿԻ ԲՈՒԹԻՐԻԼԽՈՒԼԻՆԷՍԹԵՐԱԶԻ ՆԵՐԳՈՐԾՈՒԹՅԱՄԲ  
ՍԵԲԱՑԻՆԱԹԹՎԻ ԴԻՒՈՒԼԻՆԱՅԻՆ ԷՍԹԵՐԻ ՀԻԴՐՈՒԼԻԶԻ ԿԻՆԵՏԻԿԱԿԱՆ  
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

**Մ. Ռ. ՄՆԱՏԱԿԱՆՅԱՆ, Ա. Հ. ՊԱՊՈՅԱՆ, Վ. Ա. ՍԱՄՈԿԻՇ և Ղ. Պ. ՀԱԼԵԲՅԱՆ**

Նկարագրված են կինետիկական նոր տվյալներ, որոնք հաստատում են մարդու արյան շիճուկի բուֆերիլիտիկնէսթերազ ֆերմենտի (ԲԽԷ) ներգործությամբ սեբացինաթթվի դիլիտիկնային էսթերի (ԴԽԷ<sub>8</sub>) հիդրոլիզի ընթացքում ԴԽԷ<sub>8</sub>-ի և սեբացինաթթվի մոնոլիտիկնային էսթերի (ՄԽԷ<sub>8</sub>) միջև մրցակցային մեխանիզմի խախտման փաստը: Անհատական մաքուր միացությունների հետազոտմամբ որոշվել են ԴԽԷ<sub>8</sub>-ի և ՄԽԷ<sub>8</sub>-ի  $K_m$  և  $V_{max}$  կինետիկական պարամետրերը, որոնց օգտագործմամբ կառուցվել են ռեակտիվող նյութերի կոնցենտրացիաների կախման կինետիկական հաշվարկային կորերը: Ինչպես ցույց է տալիս ստացված արդյունքների վերլուծությունը, սուբստրատների միջև ֆերմենտային հիդրոլիզի մրցակցային մեխանիզմի խախտման բացակայության պայմանների ընդունման դեպքում, ԴԽԷ<sub>8</sub>-ի և ՄԽԷ<sub>8</sub>-ի  $K_m$  և  $V_{max}$  պարամետրերի ստացված արժեքները չեն բացատրում հիդրոլիզի առաջին փուլում ռեակցիոն միջավայրում սեբացինաթթվի քանակի կուտակումը: Մրցակցային հարաբերություններից դիտարկված շեղումը բացատրելու համար մեր կողմից առաջարկվող վարկածը հիմնված է այն ենթադրության վրա, որ ԴԽԷ<sub>8</sub>-ի հիդրոլիզի արդյունքում առաջացած ՄԽԷ<sub>8</sub>-ի մոլեկուլների մի մասը ֆերմենտի ակտիվ կենտրոնից դեպի լուծույթ դանդաղ դիֆուզիայի հետևանքով “հասցնում է” ենթարկվել հիդրոլիզի:

## FEATURES OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SEBACIC ACID DICHOLINE ESTER BY SERUM BUTYRYLCHOLINESTERASE

M. R. MNATSAKANYAN<sup>1</sup>, A. H. PAPOYAN<sup>1</sup>, V. A. SAMOKISH<sup>2</sup> and G. P. HALEBYAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biotechnology  
14 Gyurjyan St., 0056, Yerevan, Armenia  
E – mail: ghukashalebyan@yahoo.com

<sup>2</sup> Institute of Analytical Instrument Engineering RAS, St. Petersburg  
E – mail: sam43@mail.ru

The new kinetic data confirming the derangement of competitive relations between two substrates DChE<sub>8</sub> and MChE<sub>8</sub> (dicholine and monocholine esters of sebacic acid respectively) during enzymatic hydrolysis of DChE<sub>8</sub> by human butyrylcholinesterase (BChE<sub>h</sub>) are stated. The Michaelis-Menten parameters for DChE<sub>8</sub> and MChE<sub>8</sub> are determined using individual substances. It was shown that in contrast to succinylcholine and succinylmonocholine for which kinetic parameters correlate as follows:  $K_m(DChE)/K_m(MChE) \approx 10^{-2}$  and  $V_{max}(DChE) / V_{max}(MChE) \approx 7$ , in case of DChE<sub>8</sub> ( $K_m(DChE) = (3.0 \pm 0.38) \times 10^{-5}$  M,  $k_{cat}(DChE) = (16.4 \pm 0.14) \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ ) and MChE<sub>8</sub> ( $K_m(MChE) = (2.2 \pm 0.28) \times 10^{-4}$  M,  $k_{cat}(MChE) = (6.09 \pm 0.91) \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ ) the values of these parameters were closer:  $K_m(DChE)/K_m(MChE) \approx 0.15$   $V_{max}(DChE) / V_{max}(MChE) \approx 2.7$ . The obtained parameters of Michaelis-Menten equation for DChE<sub>8</sub> and MChE<sub>8</sub> were applied for plotting theoretical dependences of all reactants concentration on time. As attested analysis of the obtained results, the individual parameters of Michaelis-Menten equation for DChE<sub>8</sub> and MChE<sub>8</sub> do not explain observed accumulation of sebacic acid in the reacting medium (which is nearly  $1.7 \times 10^{-4}$  M if substrate initial concentration is  $5 \times 10^{-4}$  M) in the first stage of reaction if there is no deviation from pure competitive mechanism of hydrolysis. The proposed scheme explaining the observed deviation from competitiveness is based on an assumption that the part of MChE<sub>8</sub> molecules (formed as a result of DChE<sub>8</sub> hydrolysis) manages to be hydrolyzed due to MChE<sub>8</sub> slow diffusion from active site of enzyme into reacting medium.

### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Дитилин и опыт его клинического применения. / под ред. А. Л. Мнджояна, Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1957, 7.
- [2] Brucke F. // Pharmacological reviews, 1956, v.8, p.256.
- [3] Naguib M., Samarkandi A., Raid W., Alharby S.W. // Anesthesiology, 2003, v.99, p.1045.
- [4] Naguib M., Samarkandi A., El-Din M.E., Abdullah K., Khaled M. Alharby S.W. // Anesth. Analg., 2006, v.102, p.151.
- [5] Glick D. // J. Biol. Chem., 1941, v.137, p.357.
- [6] Foldes F.F., McNall P.G., Borrego-Hinojosa J.M. // New Engl. J. Med., 1952, v.247, p.596.
- [7] Tsuji F.J., Foldes F.F. // Fed. Proc., 1953, v.12, p.374.
- [8] Алебян Г.П., Григорян Н.А., Мнджоян О.Л., Самокиш В.А. // Биоорган. химия, 1977, т.3, № 9, с.1266.
- [9] Алебян Г.П., Мнджоян О.Л., Самокиш В.А. // Биотехнология, 1999, №1, с.80.
- [10] Whittaker V.P., Wijesundera S. // Biochem. J., 1952, v.52, p. 475.

- [11] Мнацакян М.Р., Акопян Л.М., Саркисян Ж.В., Самокиш В.А., Алебян Г.П. // Биол. ж. Армени, 2007, т.59, № 3-4, с.239.
- [12] Goedde H.W., Held K.R., Altland K. // Mol. Pharmacol., 1968, v.4, p. 274.
- [13] Волкова Р.И., Дмитриева Е.Н. // Биохимия, 1976, т.41, с.264.
- [14] Бресткин А.П., Иванова Л.А., Свечникова В.В. // Биохимия, 1965, т.30, №1, с.137.
- [15] Debord J., Verneuil B., Bollinger J.-C., Merle L., Dantoine Th. // Analytical Biochemistry, 2006, v.354, p.299.
- [16] Cengiz D., Зокүґраш А.Н., Tezcan E.F. // Journal of Protein Chemistry, 2002, v.21, № 3, p.145.
- [17] Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., Мир, 1966, 816с. [Dixon M., Webb E. Enzymes. 2<sup>nd</sup> edn Longmans Green, London, 1964, 950 p.]
- [18] Grygoryan H.A., Halebyan G., Lefebvre B., Brasme B., Masson P. // Biochimica et Biophysica Acta, 2008, v.1784, p.1818.