

Г. А. ПАНОСЯН

ДЕЙСТВИЕ КИСЛОТ НА ХОЛИНЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ
СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Каталитическая активность ферментов, лишенных какой-либо простетической группы, должна зависеть либо от строения всей молекулы в целом, либо от специфического расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи молекулы фермента и особенностей их пространственной конфигурации. О том, что во многих случаях не вся белковая молекула подобных ферментов обладает каталитической активностью, говорит ряд наблюдений с некоторыми протеолитическими ферментами. Например, Перлман [14] показала, что диализуемые фрагменты молекулы пепсина, образующиеся при самопереваривании фермента, обладают каталитической активностью. Другие авторы [4, 6, 12, 13] показали наличие активного центра, т. е. активного осколка, у трипсина [3, 5].

Само собой разумеется, что обнаружение и выделение активных осколков ферментов, лишенных простетических групп, в том числе и холинэстеразы, которая и является объектом наших исследований, определения их аминокислотного состава и расположения их в полипептидной цепи, во многом поможет расшифровке химического строения активного центра, а следовательно, механизма действия данного фермента.

Имеется целый ряд работ, в которых делаются попытки судить о химическом строении активного центра холинэстеразы по ее способности связываться с некоторыми фосфорорганическими соединениями, по специфичности холинэстеразы и по действию различных антихолинэстеразных веществ [2, 8, 9]. Однако полную картину химического строения активного центра холинэстеразы может дать только выделение активного центра (осколка) и дальнейшее определение аминокислотного состава и последовательности расположения их в полипептидной цепи активного осколка при сочетании с другими методами исследования. К сожалению, необходимо отметить, что подобные осколки белковой молекулы, обладающие каталитической активностью, пока что не получены.

Мы поставили перед собой задачу получить факт наличия осколков с холинэстеразной активностью по аналогии с протеолитическими ферментами, а затем выделить их, и в дальнейшем определить их аминокислотный состав. Для этого мы решили подвергнуть холинэстеразу ферментативному расщеплению, обратив особое внимание на пепсин, так как он действует на белковую молекулу сравнительно мягче, что увеличивает возможность получения активного осколка.

Однако прежде чем приступить к определению действия пепсина на холинэстеразу, необходимо было определить, каким образом действует кислая среда на холинэстеразную активность, поскольку пепсин дей-

ствуется в сильно кислой среде. При исследовании действия кислой среды на холинэстеразную активность сыворотки человека были обнаружены интересные, по нашему мнению, факты, обсуждение которых и приводится в настоящей работе.

Нам не известны в литературе какие-либо данные по действию кислот на холинэстеразную активность, за исключением, пожалуй, того, что холинэстераза теряет свою активность в кислой среде. Например, Гликком было показано, что уже при pH 6,0 активность холинэстеразы сыворотки практически равна нулю [7, 11]. Однако при изменении pH среды до 7—8, активность снова была равна исходной.

Само собой разумеется, что подобная постановка опыта нас не могла удовлетворить; во-первых, нам необходимо были еще более меньшие значения pH, во-вторых, нас не интересовала активность холинэстеразы в кислой среде, так как мы могли определить ее в нейтральной или слабо щелочной среде уже после действия кислоты и нейтрализации. Т. е. нас интересовала не активность холинэстеразы в кислой среде, а действие кислой среды на молекулу холинэстеразы и на обратимость изменений в ней, если такие изменения имели место.

Опыты ставились на сыворотке крови человека. Холинэстеразная активность определялась обычным титрационным методом [1]. В качестве субстрата использовался ацетилхолинхлорид. В реакционную среду, состоящую из 0,1 мл сыворотки, 1,4 мл физиологического раствора, доведенного Na_2HPO_4 до pH 7,6, 0,1 мл индикатора крезолового красного, добавлялся 0,4 мл 1% раствора ацетилхолинхлорида, окраска смеси доводилась до стандартной и затем пробирка ставилась в термостат на 30 мин. при $37,5^\circ\text{C}$. Титрация проводилась 0,05N растворами NaOH.

Для изменения кислотности среды использовались: 0,1N раствор HCl, 0,05 N H_2SO_4 , 2% уксусная кислота и 0,1N лимонная кислота. Растворы кислот добавлялись в смесь в количестве от 0,05 до 0,5 мл. Смесь с кислотой инкубировалась в течение определенного времени, затем нейтрализовалась и только после этого в нейтральной или слабо щелочной среде определялась холинэстеразная активность. При добавлении в реакционную смесь определенного объема кислоты соответственно уменьшалось количество физиологического раствора. pH смеси определялась колориметрически по Михаэлису до добавления раствора ацетилхолинхлорида.

Из рис. 1 видно, что при добавлении увеличивающихся количеств различных кислот в реакционную смесь и после 10-минутной инкубации с кислотой, холинэстеразная активность постепенно уменьшается и почти исходит на нет. Подобное действие кислот на холинэстеразную активность заставило нас отказаться от идеи применить пепсиновый гидролиз для определения активных фрагментов холинэстеразы, тем более, что pH среды при добавлении испытанных нами количеств кислот был далек от оптимального для пепсина, в то время как холинэстеразная активность в этих условиях была незначительной (табл. 1).

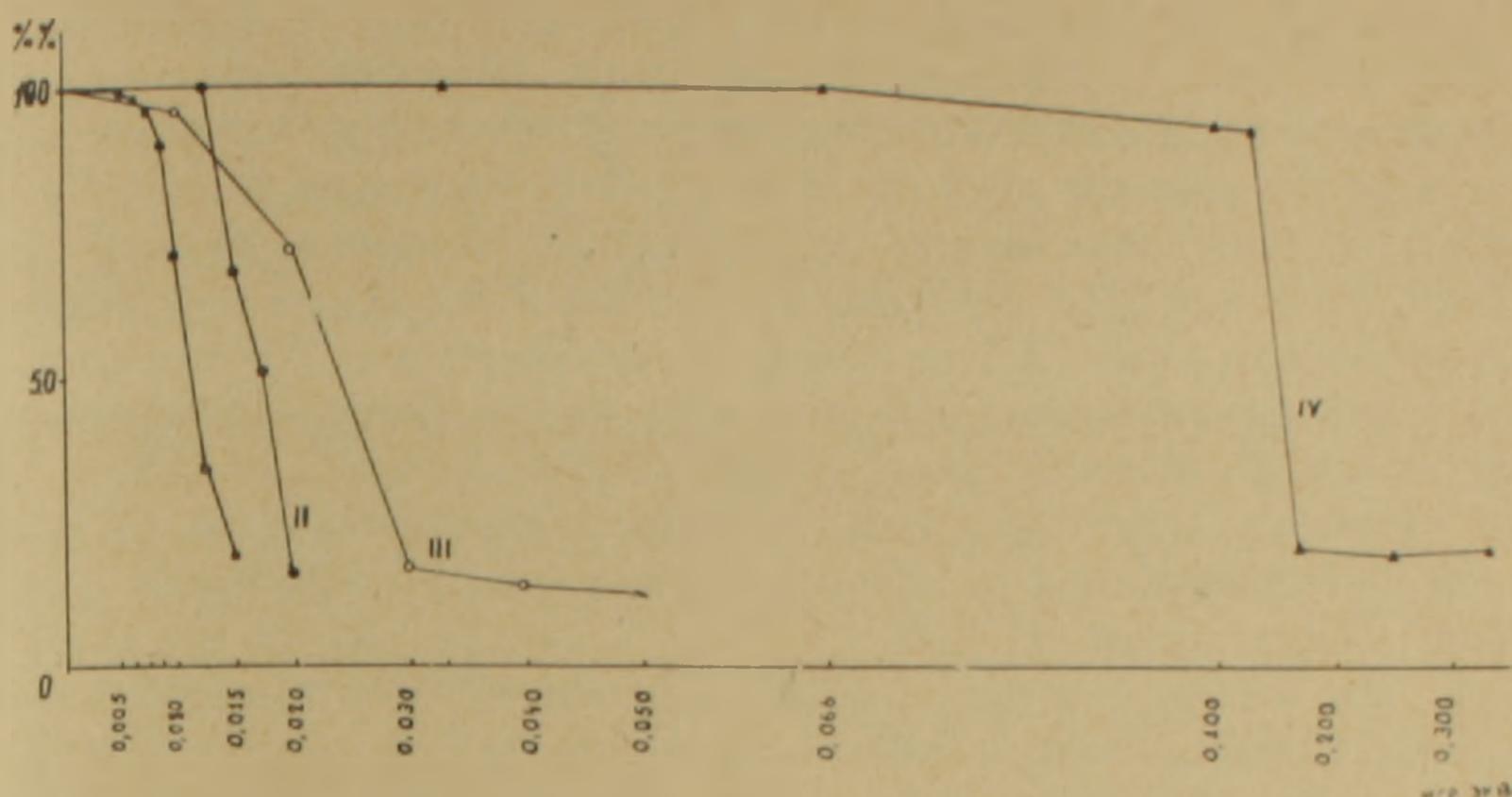


Рис. 1. Действие различных кислот на холинэстеразную активность сыворотки I—0,05N H₂SO₄; II—0,1N HCl; III—0,1N лимонная кислота; IV—2% уксусная кислота. Инкубация в кислой среде 10 мин.

Таблица 1
Влияние различных количеств кислот на холинэстеразную активность сыворотки и pH среды

| Кислота | Количество кислоты (в мг. экв) | Холинэстеразная активность (в % от исходного) | pH |
|---|--------------------------------|---|-----|
| HCl 0,1N | 0,0125 | 100 | 5,2 |
| | 0,0150 | 68 | 4,6 |
| | 0,0175 | 51 | 4,1 |
| | 0,0200 | 16 | 3,6 |
| H ₂ SO ₄ 0,05N | 0,0050 | 99 | 6,0 |
| | 0,00625 | 98 | 5,4 |
| | 0,0075 | 96 | 5,0 |
| | 0,00875 | 90 | 4,6 |
| | 0,0100 | 71 | 4,2 |
| | 0,0125 | 34 | 3,7 |
| | 0,0150 | 19 | 3,4 |
| Лимонная 0,1N | 0,01 | 96 | 5,2 |
| | 0,02 | 72 | 4,6 |
| | 0,03 | 17 | 3,7 |
| | 0,04 | 14 | 3,4 |
| | 0,05 | 13 | 3,2 |
| Уксусная 2% | 0,033 | 100 | 4,9 |
| | 0,066 | 100 | 4,7 |
| | 0,100 | 93 | 4,4 |
| | 0,133 | 92 | 4,2 |
| | 0,166 | 20 | 4,0 |
| | 0,250 | 19 | 3,8 |
| | 0,330 | 20 | 3,6 |

Однако мы попытались использовать еще одну возможность. Из работ Нортропа [6] известно, что зависимость действия пепсина от рН на различные белки различно. Например, если пепсин перестает гидролизовать казеин уже при рН 4, то полное отсутствие желатины имеется при рН 5, а гемоглобин может гидролизироваться пепсином, правда, очень слабо, даже при рН более 6. Мы попытались использовать этот факт, и в дальнейших опытах старались найти такие варианты, где можно было бы употребить значения рН, при которых как активность холинэстеразы, так и пепсина были бы значительными.

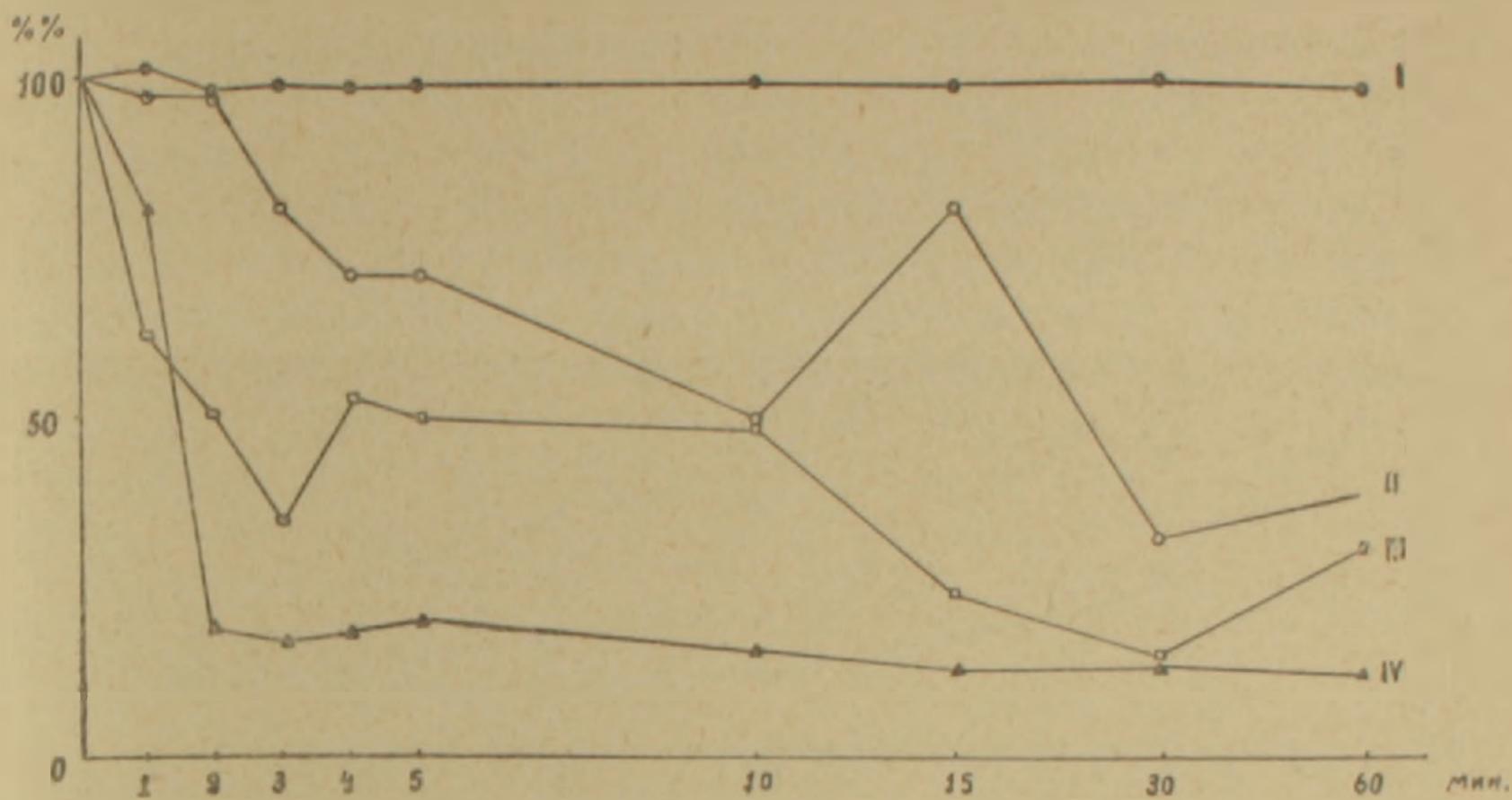
Поэтому, естественно, необходимо было определить сколько длительно может сохранить свою активность сывороточная холинэстераза при том или ином значении рН.

Для этой цели в ряд пробирок с реакционной смесью добавлялось равное количество какой-либо кислоты и через 1, 2, 3 и т. д. минут 1N раствором NaOH нейтрализовалось, после чего в них определялась холинэстеразная активность.

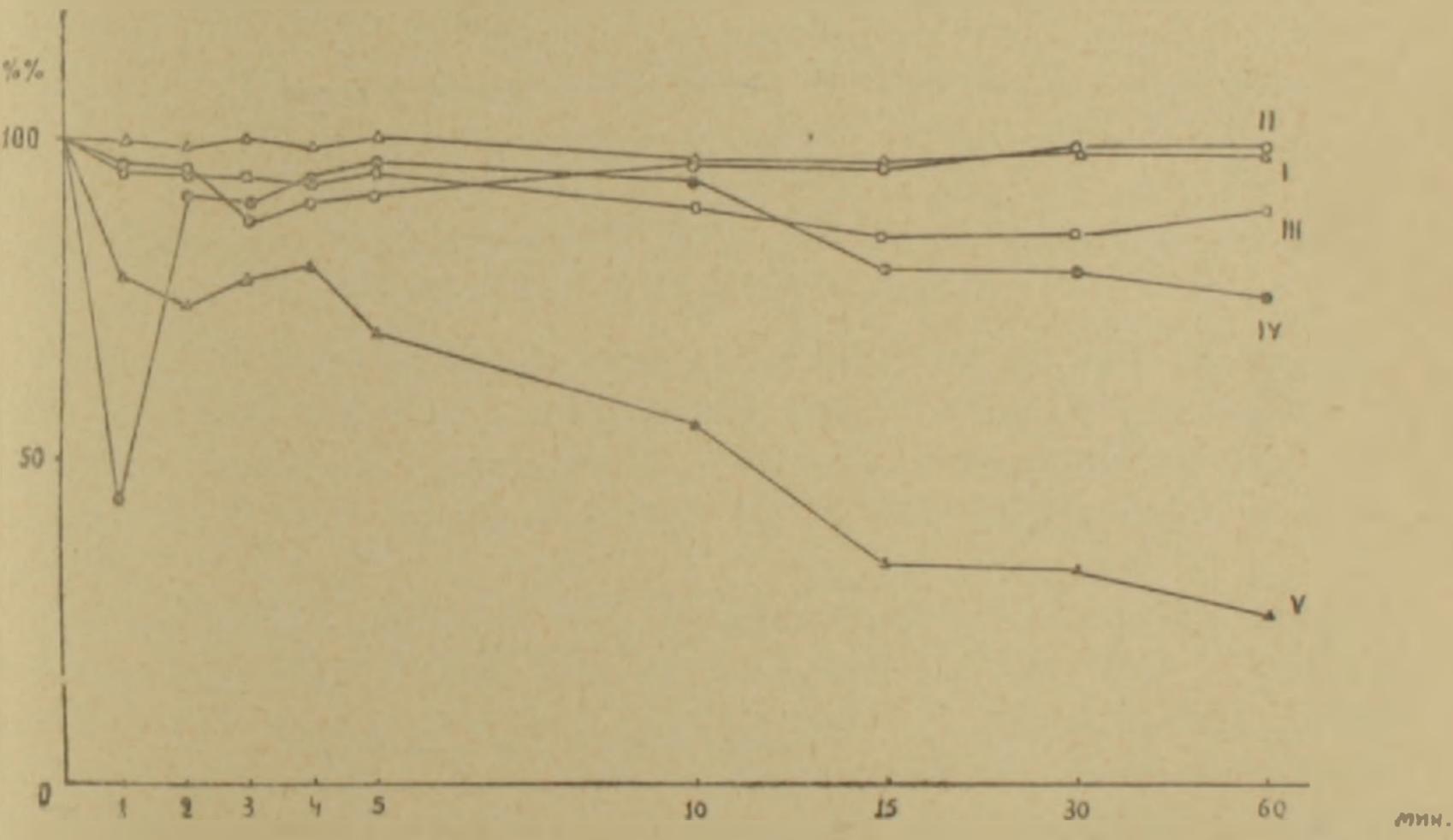
При этом обнаружено следующее интересное явление. Если в реакционную смесь добавляется по 0,125 мл 0,1N HCl, то ни в первых, ни в последующих минутах (в течение одного часа и более) инкубации с кислотой (рис. 2А) какое-либо изменение в активности холинэстеразы не наблюдается. При добавлении 0,2 мл 0,1N HCl активность уже в первые же минуты инкубации резко уменьшается и сохраняется в течение 1 ч. и более на уровне 15—20% от исходного уровня. При этом необходимо отметить, что в этих условиях спонтанный гидролиз ацетилхолина равен 5—8%. Следовательно, действительная активность холинэстеразы равна в этих условиях 10—15 от исходного уровня. При действии же 0,15 мл и 0,175 мл 0,1N HCl наблюдается не постепенное уменьшение активности холинэстеразы, как это нужно было ожидать, а довольно зигзагообразная кривая с периодическими спадами и подъемами. Вначале мы это явление приняли за ошибку, однако в дальнейшем оказалось, что подобная «флюктуация» активности или, что то же, инактивации, всегда наблюдается в большей или меньшей степени. То же явление наблюдается и при добавлении в реакционную среду серной, уксусной и в меньшей степени лимонной кислоты (рис. 2Б, В, Г). При определении рН той реакционной среды, в которой наблюдается «флюктуация», было обнаружено, что это явление имеет место в определенных значениях рН (4,0—4,5) и несколько не зависит от количества кислоты. Количество уксусной кислоты вызывало одно и то же явление «флюктуации» в 10—12 раз больших концентрациях, чем соляная кислота.

На рис. 3 представлены несколько опытов, где в реакционную смесь добавляется такое количество соляной кислоты, которое вызывает «флюктуацию» активности холинэстеразы. Из рисунка видно, что подобная «флюктуация» закономерно повторяется во всех случаях, хотя и характер «флюктуации» во многих случаях различен.

Многочисленные опыты с различными концентрациями кислот и с различными сыворотками показали, что всегда при действии определен-



А



Б

Рис. 2. А. В. Зависимость холинэстеразной активности от времени инкубации в кислой среде. А—0,1N HCl. I—0,125 мл, pH 5,2; II—0,15 мл, pH 4,6; III—0,175 мл, pH 4,1; IV—0,20 мл, pH 3,6. Б—0,05N H₂SO₄. I—0,125 мл, pH 5,4; II—0,15 мл, pH 4,9; III—0,175 мл, pH 4,7; IV—0,20 мл, pH 4,3; V—0,25 мл, pH 3,7.

ных количеств кислот холинэстеразная активность сыворотки подвергается «флюктуации», однако при этом трудно установить ту концентрацию кислоты, или то значение pH, при котором начинается или кончается «флюктуация». Однако несомненно, что имеется определенный интервал изменений pH среды: 3,8—4,8 (для каждой отдельной сыворотки и в особенности для каждого отдельного опыта этот интервал уменьшается), при котором выдерживание сыворотки приводит к колебаниям холинэсте-

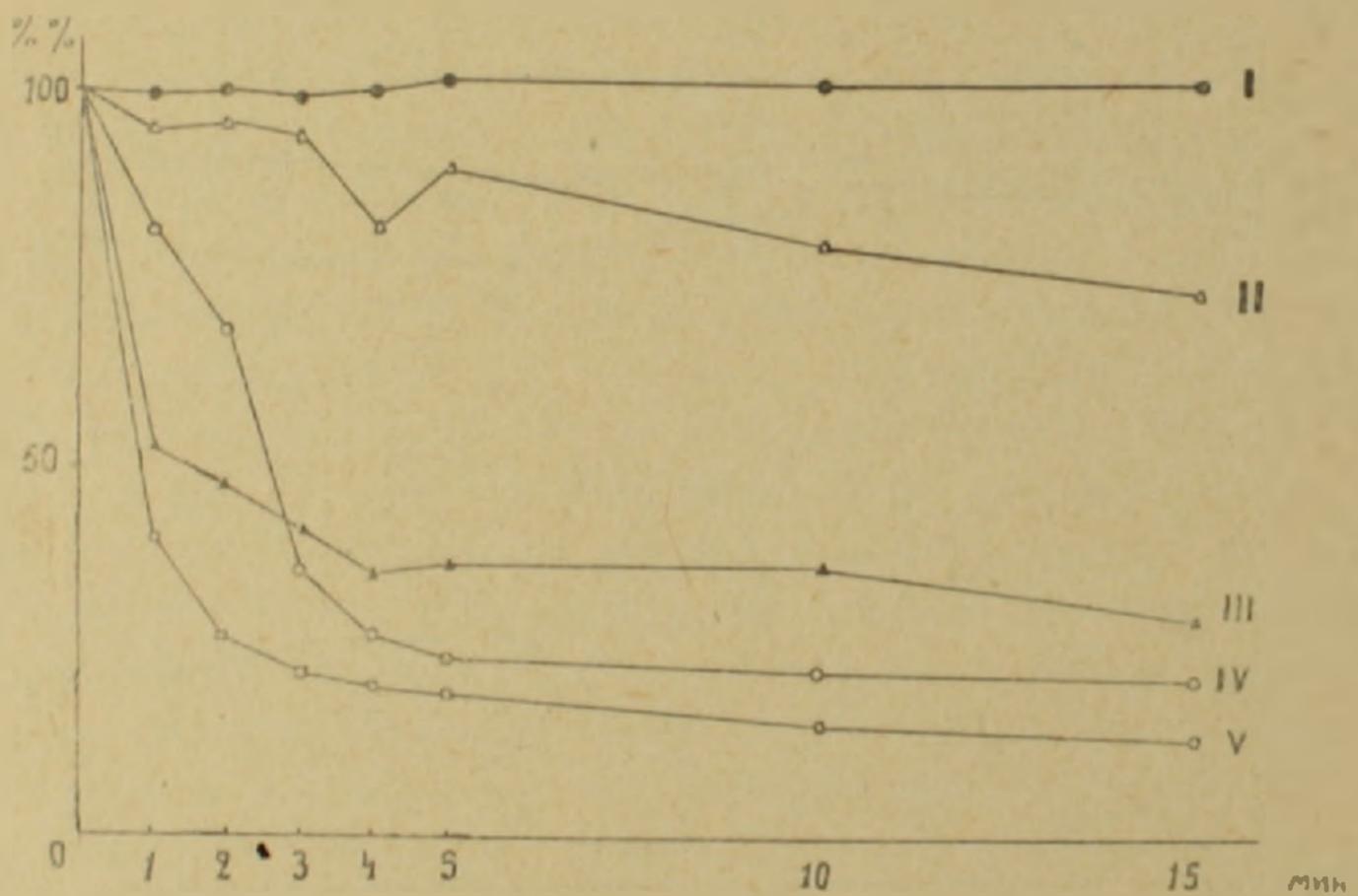
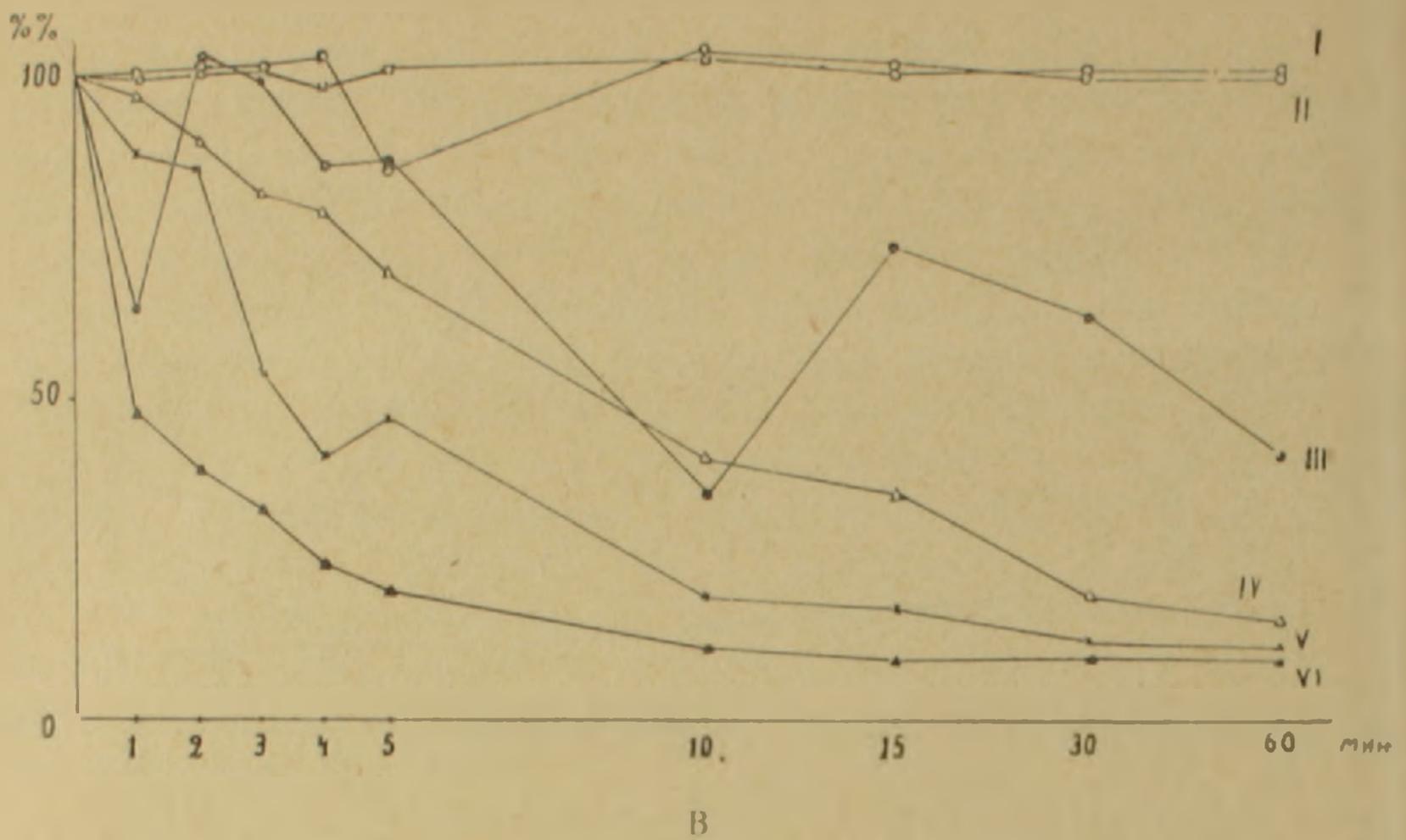


Рис. 2 В. Г. Зависимость холинэстеразной активности от времени инкубации в кислой среде. В—2% уксусная кислота. I—0,1 мл, pH 5,2; II—0,2 мл, pH 4,7; III—0,3 мл, pH 4,4; IV—0,4 мл, pH 4,2; V—0,5 мл, pH 4,0. VI—0,75 мл, pH 3,8. Г—0,1N лимонная кислота. I—0,1 мл, pH 5,2; II—0,2 мл, pH 4,6; III—0,25 мл, pH 4,1; IV—0,3 мл, pH 3,7; V—0,4 мл, pH 3,4.

разной активности. Причем при более высоких значениях pH в пределах этого интервала наблюдаются редкие спады при общем высоком уровне холинэстеразной активности (наподобие холинэстеразной активности, наблюдаемой при действии 0,2 мл 0,05N серной кислоты, приведенной на рис. 2 Б). С уменьшением значения pH спады холинэстеразной активности принимают более регулярный характер и наблюдается типичная

картина «флюктуации» (рис. 3). При более низких значениях pH, в пределах же этого интервала, наблюдается низкий фон холинэстеразной активности с редкими подъемами активности в виде отдельных пиков (рис. 2 А, кривая II, или рис. 2 Б, кривая III и V).

Таким образом, из всего сказанного можно заключить, что при некоторых значениях pH холинэстеразная активность сыворотки человека периодически уменьшается и вновь восстанавливается с определенной частотой. Об амплитуде и частоте колебания трудно судить, так как нам

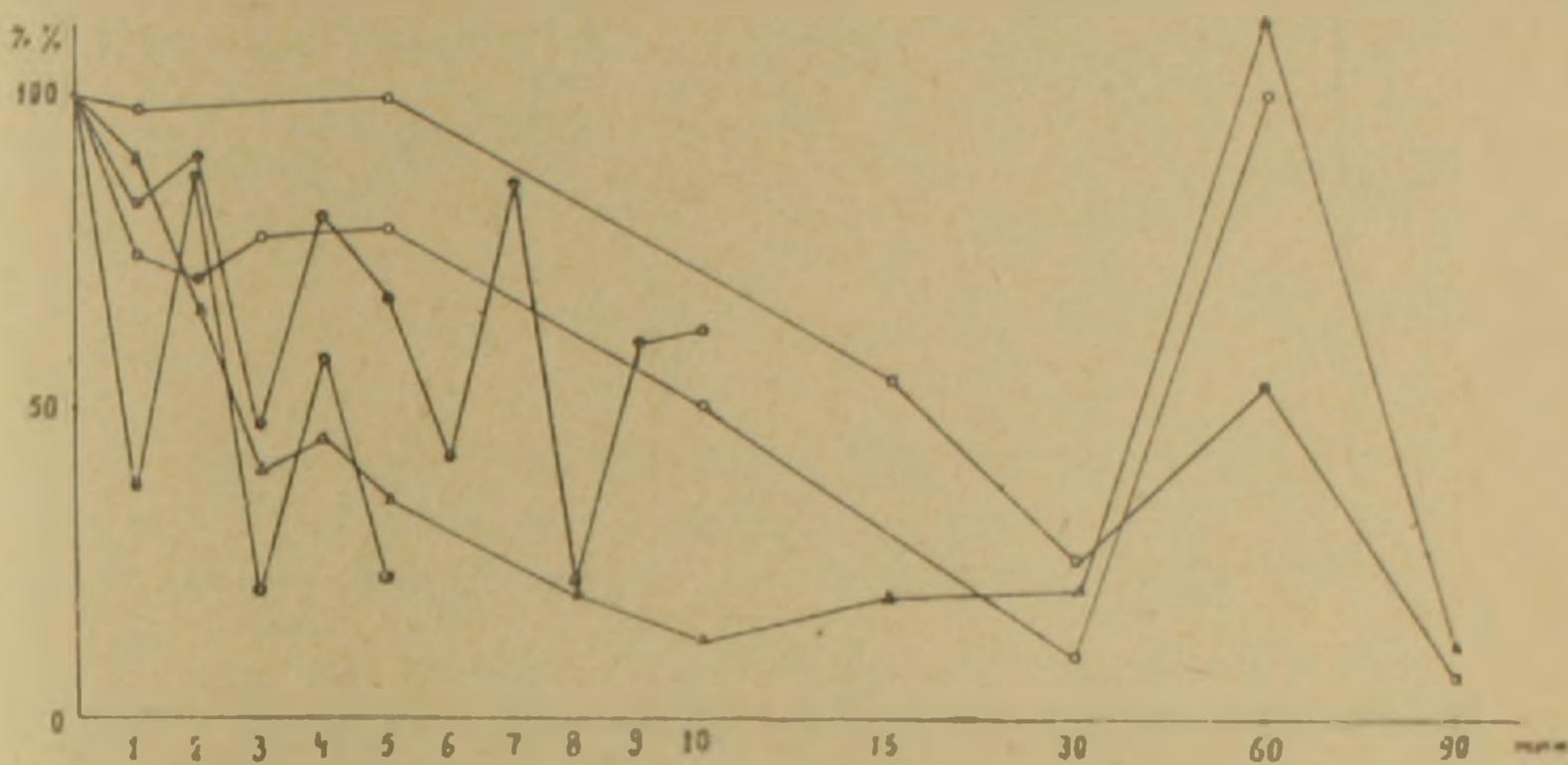


Рис. 3. Зависимость холинэстеразной активности от времени инкубации в соляной кислоте. 0,15 мл 0,1N HCl, pH 4,3–4,5.

не известно, в какой именно момент мы производим нейтрализацию, или иначе, в каком состоянии с повышенной или с пониженной активностью мы «зафиксировали» холинэстеразу сыворотки (предполагая, что нейтрализация, действительно, обладает такой «фиксирующей» способностью).

Об амплитуде колебания мы можем судить по тем точкам кривых, которые получены в разных опытах. Во многих случаях нам удавалось получить при «флюктуации» холинэстеразную активность, равную исходной. В других же случаях были получены значения холинэстеразной активности, близкие к величинам спонтанного гидролиза ацетилхолина. Отсюда можно заключить, что амплитуда колебания холинэстеразной активности может изменяться от нулевого значения (или почти нулевого значения) до максимальных, исходных значений.

Что же касается частоты колебания, то для ее определения мы провели серию опытов, в которых нейтрализация среды производилась через каждые 15 сек. На рис. 4 приведен один из таких опытов. Эти опыты показывают, что частота колебания большая, чем 1 колебание в 15 сек., за исключением первых 90 сек. Поэтому понятно, то разнообразие кривых «флюктуации», которое мы получаем в наших опытах, так как нейтрализация производится через каждую минуту и активность холинэстеразы определяется каждый раз в различных точках кривой изменения

холинэстеразной активности. Интересно отметить, что «флюктуация» наблюдается, по крайней мере, в течение часа (рис. 5).

Судить о природе подобной «флюктуации» на основании наших опытов очень трудно. Поскольку мы в наших опытах использовали цельную

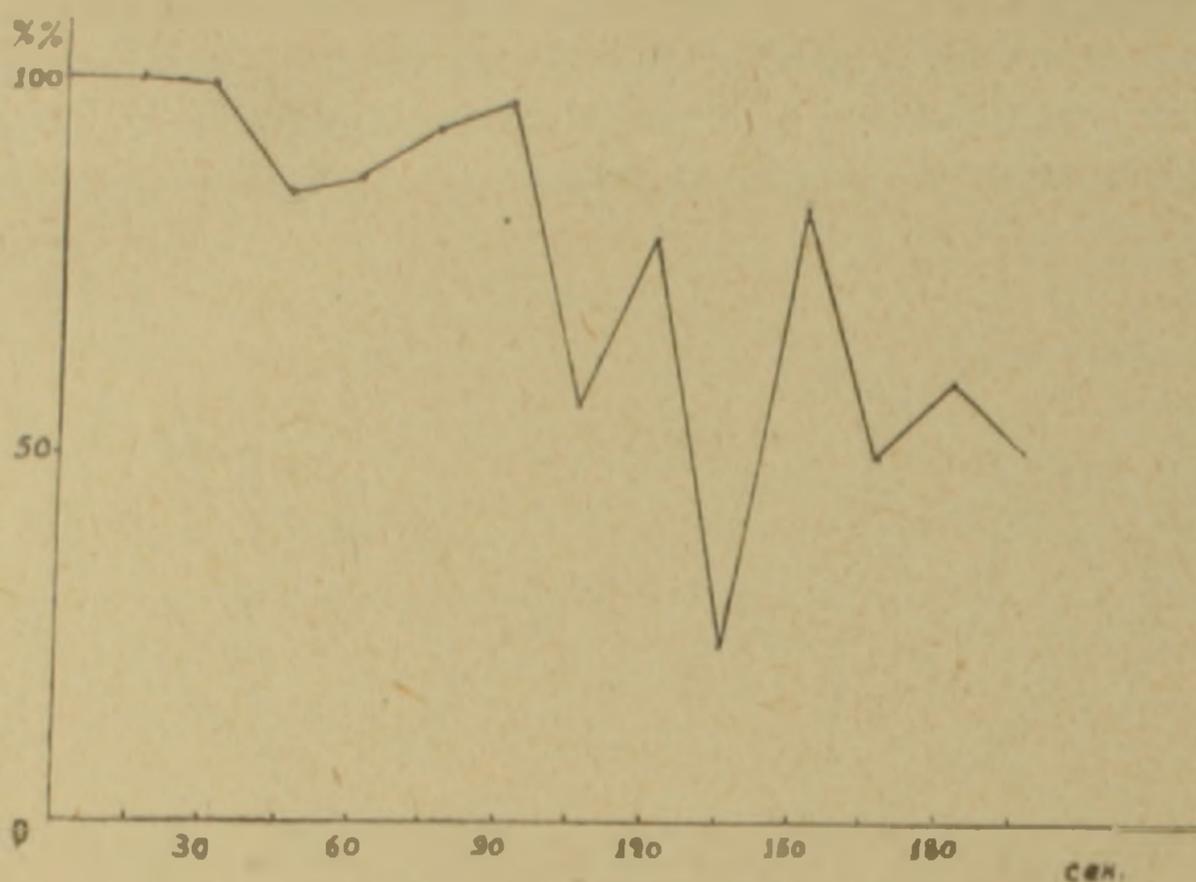


Рис. 4. «Флюктуация» холинэстеразной активности при нейтрализации среды через каждые 15 сек. 0,15 мл 0,1N HCl, pH 4,3.

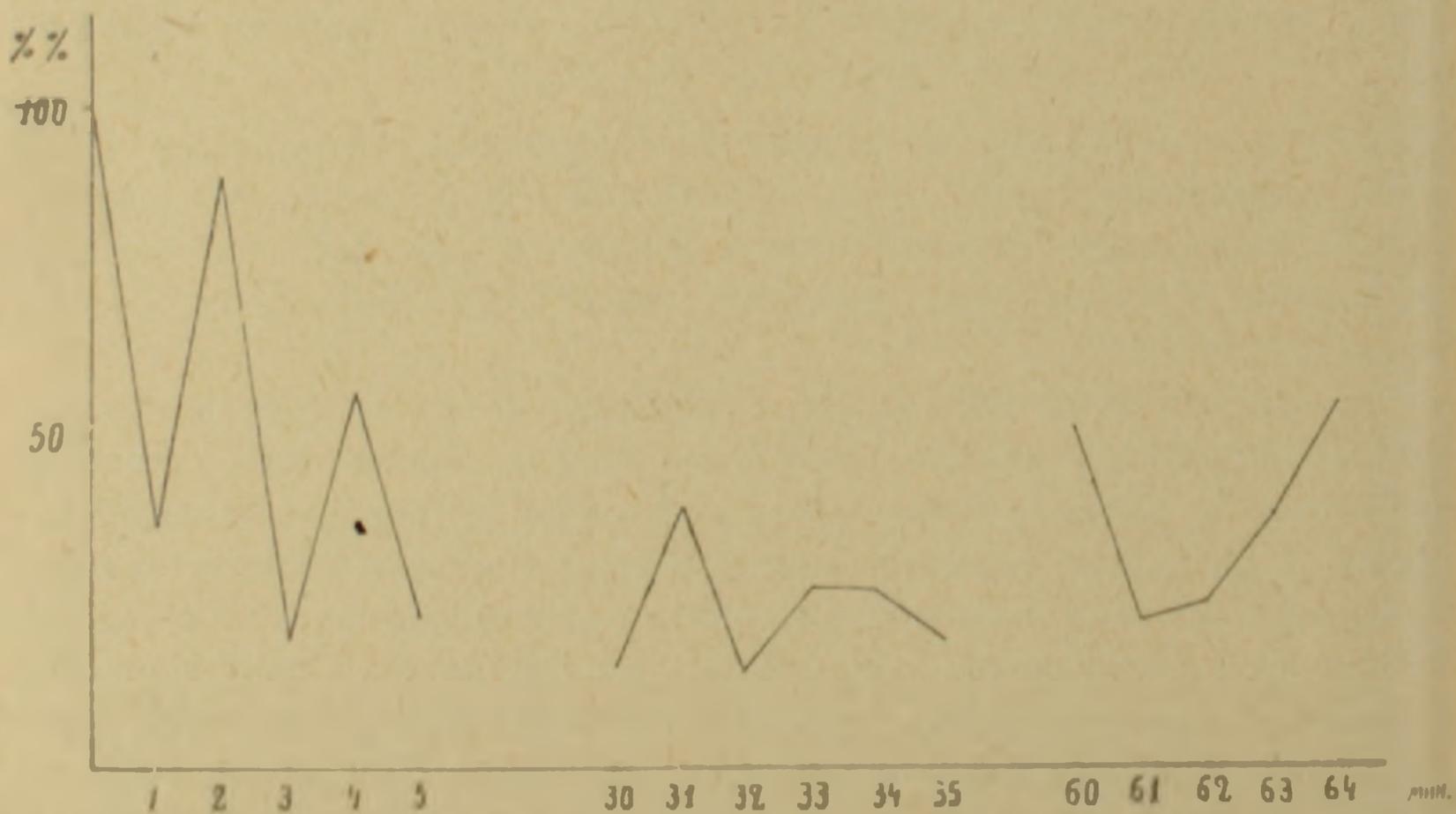


Рис. 5. «Флюктуация» холинэстеразной активности при нейтрализации среды через каждую минуту в разные интервалы времени инкубации (0—5 мин., 30—35 мин., 60—64 мин.), 0,15 мл 0,15N HCl, pH 4,4.

сыворотку, то трудно сказать, что является причиной «флюктуации»: изменение состояния самой холинэстеразы или изменения состояний других компонентов сыворотки, благодаря чему они приобретают способность влиять на холинэстеразу, инактивируя ее.

Независимо от того, что лежит в основе «флюктуации», дальнейшее исследование этого факта, как нам кажется, чрезвычайно интересно. Поэтому дальнейшим этапом нашей работы должно быть исследование влияния кислот на активность более или менее очищенной холинэстеразы.

Что же касается получения активных осколков холинэстеразы при помощи гидролиза пепсином, то необходимо признать, что в этом случае необходимо подобрать другие ферментативные протеолитические системы, до тех пор, пока не будет окончательно выяснено, что лежит в основе кислотного инактивирования и обратимо ли оно.

Кафедра физиологии человека и животных
Ереванского государственного университета

Поступило 1.III 1961 г.

Գ. Ն. ՓԱՆՈՅԱՆ

ԽՐՈՒՆԵՐԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԱՐԳՈՒ ԱՐՅԱՆ ԶԻՃՈՒԿԻ ԽՈՒԻՆԷՍՏԵՐԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հետազոտվել է աարբեր թթուների (ադալթու, ծծմբական թթու, քաղցախաթթու և էխսրոնաթթու) ազդեցությունը մարդու արյան շիճուկի խոլինէսթերազային ակտիվության վրա:

Պարզվել է, որ վերոհիշյալ թթուները, սեակցիոն միջավայրի մեջ ավելացնելու դեպքում, ինակտիվացնում են խոլինէսթերազային, բնդ որում թթուների կոնցենտրացիան մեծացնելիս ինակտիվացիայի աստիճանը բարձրանում է:

Հոդվածում ցույց է արված, որ ինակտիվացիայի աստիճանը կախված է ոչ թե թթվի քաղցարձակ բանակությունից, այլ միջավայրի pH-ի փոփոխությունից: pH-ի որոշակի մեծությունների դեպքում (4,0—4,7) նկատվում է խոլինէսթերազայի ակտիվության տատանում, որի ամպլիտուդան փոփոխվում է նորմալից մինչև զերո, որը կախված է թթու միջավայրում շիճուկի ինկուրացիայի մամանակից:

Տատանման հաճախականությունն ավելի մեծ է, քան մեկ տատանում 15 վրկ.: Ակտիվության նման տատանումը կամ խոլինէսթերազայի ակտիվության «ֆլչուկտուացիան» նկատվում է 60 և ավելի րոպե թթու միջավայրում ինկուրացիայի մամանակ:

Անխազրվում է, որ ավյալ ֆլչուկտուացիայի հիմքում ընկած են կամ ֆերմենտի սպիտակուցային մոլեկուլում կատարվող փոփոխությունները, կամ շիճուկի մյուս կամպոնենտների մոլեկուլներում եղած փոփոխությունները, որոնք, իրենց հերթին ազդում են խոլինէսթերազայի ակտիվության վրա:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. В а л а х о в с к и й С. Д. и В а л а х о в с к и й П. С. Методы химического анализа крови. Медгиз, 1953.
2. Б а р л о у Р. Введение в химическую фармакологию. ИЛ, 1959.

3. Бреслер С. Е. В кн.: Белки, их специфические свойства, стр. 63--80, Киев, 1955.
4. Бреслер С. Е., Гликина М. В. и Френкель С. Я. Доклады АН СССР, 96, 565, 1954.
5. Мосолов В. В. Успехи совр. биол., 50, 3(6), стр. 277--293, 1960.
6. Нортроп Д., Кунитц М. и Херриотт Р. Кристаллические ферменты, ИЛ, 1950.
7. Самнер Дж. Б. и Сомерс Г. Ф. Химия ферментов и методы их исследования, ИЛ, 1948.
8. Черников М. П. Биохимия, 21, 295, 1956.
9. Cohen J. A., Jansz H. S., Oosterbaan R. A. Biochem. et biophys. acta, 20, 402, 1956.
10. Cohen J. A., Oosterbaan R. A., Warringa M. G. P. J., Jansz H. S. Disc Faraday Soc., 20, 114, 1955.
11. Glik D. Biological Symposia, V, p. 213, 1941.
12. Hess G. P., Wainfan E. J. Am. Chem. Soc., 80, 501, 1958.
13. Nord F. F., Bier M., Terminiello L., Arch. Biochem. and biophys., 65, 1200, 1956.
14. Perlmann G. E., Nature, 173, 406, 1954.