



Биолог. журн. Армении, 3 (61), 2009

“АНОМАЛЬНАЯ” КИНЕТИКА ГИДРОЛИЗА ДИХОЛИНОВОГО ЭФИРА ПРОБКОВОЙ КИСЛОТЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛОШАДИНОЙ СЫВОРОТОЧНОЙ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

М.Р. МНАЦАКАНЯН

ЗАО “НИИ Биотехнологии” МЭ РА

Исследован ферментативный гидролиз дихолинового эфира пробковой кислоты (ДХЭ₆) под действием бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади (БХЭ_л). Установлено, что в системе БХЭ_л + ДХЭ₆ на первой стадии гидролиза накопление пробковой кислоты (ДК₆), в отличие от БХЭ_ч (сыворотки крови человека) + ДХЭ₈ (дихолиновый эфир себадиновой кислоты), происходит исключительно вследствие нарушения отношений между ДХЭ₆ и монохолиновым эфиром пробковой кислоты (МХЭ₆). Показано, что вопреки сильной разнице реакционных способностей ДХЭ₆ и МХЭ₆ (приблизительно в 450 раз) в течение первой стадии ~ 40% ДХЭ₆ превращается в ДК₆. Предложен возможный механизм, объясняющий данный тип нарушения конкурентности.

Бутирилхолинэстераза – дихолиновый эфир пробковой кислоты – кинетика гидролиза – нарушение конкурентности

Ուսումնասիրվել է խցանաթթվի դիխոլինային էսթերի (ԴԽԷ₆) ֆերմենտատիվ հիդրոլիզը ձիու արյան շիճուկի բույրիլիլխոլինէսթերազի (ԲԽԷ_լ) ազդեցությամբ: Հաստատված է, որ ԴԽԷ₆ + ԲԽԷ_լ համակարգում հիդրոլիզի առաջին փուլում խցանաթթվի կուտակումը, ի տարբերություն ԴԽԷ₈ (սեբացինաթթվի դիխոլինային էսթեր) + ԲԽԷ_չ (մարդու արյան շիճուկի բույրիլիլխոլինէսթերազ) համակարգի, տեղի է ունենում բացառապես ԴԽԷ₆-ի և խցանաթթվի մոնոխոլինային էսթերի (ՄԽԷ₆) միջև հարաբերության խախտման հետևանքով: Յույց է տրված, որ չնայած ԴԽԷ₆-ի և ՄԽԷ₆-ի ռեակցիոնունակության մեծ տարբերությանը (գրեթե 450 անգամ), ռեակցիայի առաջին փուլում ԴԽԷ₆-ի մոտ 40%-ը վեր է անվում խցանաթթվի: Առաջարկված է հնարավոր մեխանիզմ, որը բացատրում է մրցակցության խախտման այս տիպը:

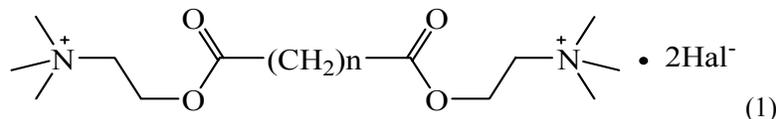
Բույրիլիլխոլինէսթերազ - խցանաթթվի դիխոլինային էսթեր - հիդրոլիզի կինետիկա - մրցակցության խախտում

The enzymatic hydrolysis of suberic acid dicholine ester (DChE₆) by horse blood serum butyrylcholinesterase (BChE_h) has been studied. It was found out that in contrast to BChE_{hum} (human serum butyrylcholinesterase) + DChE₈ (sebatic acid dicholine ester) system, the accumulation of suberic acid (DA₆) in the BChE_h + DChE₆ system during the first stage of hydrolysis occurs exclusively as a result of the disturbance of the ratio between DChE₆ and suberic acid monocholine ester (MChE₆). It was shown that despite of the strong difference of reactivities of DChE₆ and MChE₆ (approximately 450 times) approximately 40% of DChE₆ is converted into DA₆ during the first stage. A possible mechanism explaining this type of the disturbance of competitiveness was proposed.

Butyrylcholinesterase – suberic acid dicholine ester – kinetics of hydrolysis disturbance of competitiveness

Известно, что болезнь Альцгеймера тесно связана с соотношением активности холинацетилтрансферазы, ацетихолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы в пресинаптических ганглиях мозга. Один из путей лечения этой болезни основан на применении антихолинэстеразных препаратов, имеющих различное сродство к ацетилхолинэстеразе (АХЭ, НФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразе (БХЭ, НФ 3.1.1.8) – *такрин*, *ривастигмин*, *галантамин*, *донепезил* [10, 13, 16]. В связи с этим наблюдается новый всплеск особого внимания к холинэстеразам (ХЭ) и, в частности, к БХЭ. Научные исследования последних лет направлены как к поиску новых высоко-специфичных обратимых ингибиторов холинэстеразного катализа, так и изучению активных центров и механизмов каталитического действия упомянутых ферментов [12, 19].

Дихолиновые эфиры алифатических дикарбоновых кислот (ДХЭ),



которые являются физиологически активными веществами (из них дихолиновый эфир янтарной кислоты □ дитилин широко применяется в хирургической практике в качестве анестезирующего препарата [5, 6, 9, 15]), одновременно являются прекрасными объектами для исследования каталитических свойств БХЭ, корреляций типа структура – биологическая активность [14].

До публикаций последних лет [7, 11] считалось, что независимо от длины полиметиленовой цепи в кислотном фрагменте молекулы ДХЭ реакция холинэстеразного гидролиза этих субстратов протекает двухстадийным механизмом, без нарушения чисто конкурентных отношений. При этом в течение первой стадии гидролиза под действием фермента расщепляется только одна из эфирных связей, в результате чего образуются монохолиновый эфир (МХЭ) и холин. Вторая стадия реакции - гидролиз МХЭ (он начинается только после практически полного исчерпания ДХЭ в реакционной среде), в результате которого образуется дикарбоновая кислота (ДК) и холин [2, 3, 14, 17].

Однако в недавних наших работах [7, 8, 11] было показано, что ферментативный гидролиз ДХЭ высших дикарбоновых кислот, начиная с пробковой кислоты ($n \square 6$), под действием БХЭ сыворотки крови человека (БХЭ_ч) протекает с существенными отклонениями от вышеописанного механизма. Накопление дикарбоновой кислоты наблюдается не только после полного исчерпания ДХЭ, но также протекает параллельно гидролизу ДХЭ в течение первой стадии [8]. В этой же работе показано, что при гидролизе ДХЭ себаценовой кислоты (ДХЭ₈) “преждевременное” образование ДК происходит по двум механизмам параллельно: по механизму конкурирующих субстратов (механизм - А) и ранее неизвестному механизму (механизм - Б), который предполагает нарушение конкурентности между молекулами субстратов ДХЭ и МХЭ. Суть нарушения конкурентности заключается в том, что некоторая доля молекул монохолинового эфира себаценовой кислоты (МХЭ₈), образуемая в активном центре фермента (в результате гидролиза ДХЭ₈), гидролизуется, не “успевая” покинуть его.

В настоящей работе показано, что при ферментативном гидролизе ДХЭ пробковой кислоты (ДХЭ₆) под действием БХЭ сыворотки крови лошади (БХЭ_л) “преждевременное” образование пробковой кислоты протекает при полном отсутствии механизма А, и накопление ДК на первой стадии гидролиза ДХЭ протекает исключительно по механизму Б, т.е. только вследствие нарушения конкурентных отношений между ДХЭ₆ и (МХЭ₆).

Материал и методика. Скорость ферментативного гидролиза ДХЭ₆ определяли методом прямого потенциметрического титрования образующихся при гидролизе кислотных продуктов в реакционной среде, содержащей 4×10^{-3} М фосфатного буфера на приборе pH-stat марки “Radiometer Analytical TitraLab854”. Определения проводили в термостатируемой ячейке прибора при $25 \pm 0.1^\circ$ и pH 7.0 ± 0.05 . Начальная концентрация субстрата в реакционной среде составляла $2 \times 10^{-4} \div 2 \times 10^{-3}$ М. В качестве титранта использован 0.1 М раствор NaOH. Препарат БХЭ_н с удельной активностью 100 Е/мг производства РФ. Дихолиновый эфир пробковой кислоты синтезирован согласно описанной методике [2, 5, 6, 14].

Наличие в реакционной среде дикарбоновой кислоты на разных этапах реакции определяли качественно методом тонкослойной хроматографии с использованием подвижной фазы бензол - метиловый спирт - уксусная кислота, с соотношением объемов 45:8:4 соответственно и проявителя – бромкрезолового пурпурного.

Результаты и обсуждение. Кинетика полного ферментативного гидролиза ДХЭ₆. На рис.1 показана зависимость накопления “кислотного продукта” (рассчитанная исходя из расхода количества титранта – NaOH) в течение реакции холинэстеразного гидролиза ДХЭ₆ при его начальной концентрации, равной 3.0×10^{-4} М. Здесь под “кислотным продуктом” подразумеваются как МХЭ₆, так и ДК₆, кислотные группы которых при данных значениях pH 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 [18]. Сначала накопление кислотного продукта в реакционной среде происходит монотонно, практически с постоянной скоростью. Линейное нарастание концентрации продукта наблюдается до накопления его определенного количества, равного приблизительно 4.2×10^{-4} М, при достижении которого кинетика реакции меняется, что выражается в резком снижении скорости реакции гидролиза и отклонении зависимости от линейности. Учитывая низкую скорость реакции гидролиза МХЭ₆, для проведения эксперимента в приемлемом временном интервале в реакционную систему добавлено дополнительное количество фермента (в двадцать раз превышающее начальное количество, что, безусловно, учтено в расчетах кинетических параметров и построении теоретической кривой).

Далее, как показано на рис. 1, кр. а, скорость реакции монотонно убывает и по достижении кислотного продукта, равного ожидаемому теоретическому количеству (два эквивалента на 1 М ДХЭ₆), скорость реакции приближается к нулю.

Таким образом, общая картина кинетического поведения гидролиза ДХЭ₆ соответствует ранее описанному ферментативному гидролизу ДХЭ. Однако концентрация кислотного продукта в конце первой стадии ферментативного гидролиза, т.е. до момента отклонения зависимости от практически линейной, значительно больше ожидаемого 3×10^{-4} М и равна $\sim 4.2 \times 10^{-4}$ М.

Результаты хроматографического анализа реакционной смеси гидролиза ДХЭ₆ показали наличие возрастающего количества дикарбоновой кислоты практически в течение всей реакции.

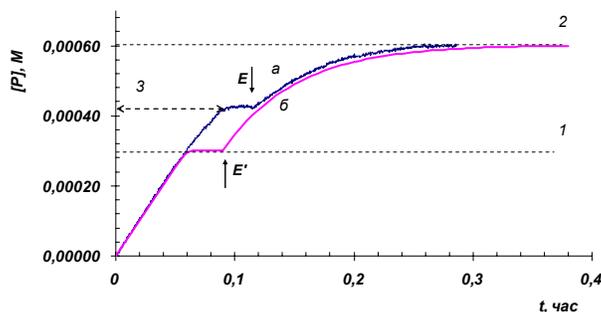


Рис 1. Зависимость накопления кислотного продукта в реакции ферментативного гидролиза субстрата, при $[ДХЭ_6]_0 = 3 \cdot 10^{-4}$ М, под действием БХЭ от времени (а- экспериментальная и б- расчетная). Пунктирными линиями 1 и 2 указано ожидаемое количество кислотного продукта в конце первой и второй стадий реакции, а пунктирной линией 3– наблюдаемое в эксперименте количество кислотного продукта в конце первой стадии (остальные условия эксперимента в тексте).

Определение константы ингибирования (K_i) холина. Значение K_i для холина определяли исходя из предположения о конкурентном типе ингибирования реакции гидролиза МХЭ₆ и соответственно использовали известное уравнение (2)

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

где $V_{(МХЭ)}$ – наблюдаемая начальная скорость реакции гидролиза МХЭ₆ в присутствии холина, $V_{\max(МХЭ)}$ – максимальная скорость реакции гидролиза МХЭ₆, $K_m(МХЭ)$ – константа Михаэлиса, K_i – константа ингибирования холина, $[холин]$ – концентрация холина в реакционной смеси.

Начальные скорости реакции гидролиза МХЭ₆ определяли по данным второй стадии ферментативного гидролиза ДХЭ₆. В экспериментах начальная концентрация МХЭ₆ составляла $2.0 \cdot 10^{-4}$, $3.3 \cdot 10^{-4}$ и $2.0 \cdot 10^{-3}$ М, а полученные значения K_i равны $(0.7 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$, $(1.5 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$ и $(1.2 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$ М соответственно. Для дальнейших расчетов использовано среднее значение полученных данных, составляющее $(1.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$ М.

Расчет теоретических кривых двухстадийного ферментативного гидролиза ДХЭ₆. Для построения расчетных кинетических зависимостей реакции ферментативного гидролиза ДХЭ₆ нами использованы как данные, приведенные выше, так и ранее опубликованные результаты исследований индивидуальных соединений ДХЭ₆ и МХЭ₆ [1]. Ниже приведены значения K_m и V_{\max} для ДХЭ₆ и МХЭ₆ и K_i холина, примененные для расчетов; значение $K_m(ДХЭ_6)$ равно $(0.89 \pm 0.04) \cdot 10^{-6}$ М; $K_m(МХЭ_6)$ равно $(0.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$ М; соотношение $V_{\max(ДХЭ_6)}/V_{\max(МХЭ_6)}$ равно 4.5; значение K_i холина равно $(1.1 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$ М.

Расчеты суммарной скорости ферментативной реакции гидролиза конкурирующих субстратов проводили по уравнению (3) [4]:

$$V = V_{(МХЭ)} + V_{(ДХЭ)}, \quad (3)$$

где V – скорость суммарной реакции для смеси, содержащей МХЭ₆ и ДХЭ₆, $V_{(МХЭ)}$ и $V_{(ДХЭ)}$ скорости превращений МХЭ₆ и ДХЭ₆ в реакционной смеси субстратов, выражаемые уравнениями (4) и (5):

$$V_{(MXЭ)} = \frac{V_{\max(MXЭ)}}{1 + \frac{K_{m(MXЭ)}}{[MXЭ]} \cdot \left(1 + \frac{[ДХЭ]}{K_{m(ДХЭ)}}\right) \cdot \left(1 + \frac{[холин]}{K_i}\right)}, \quad (4)$$

$$V_{(ДХЭ)} = \frac{V_{\max(ДХЭ)}}{1 + \frac{K_{m(ДХЭ)}}{[ДХЭ]} \cdot \left(1 + \frac{[MXЭ]}{K_{m(MXЭ)}}\right) \cdot \left(1 + \frac{[холин]}{K_i}\right)}, \quad (5)$$

$K_{m(MXЭ)}$ и $K_{m(ДХЭ)}$ – константы Михаэлиса $MXЭ_6$ и $ДХЭ_6$ соответственно, K_i – константа ингибирования холина, $V_{\max(MXЭ)}$ и $V_{\max(ДХЭ)}$ – максимальные скорости реакций гидролиза, $[I]$, $[MXЭ]$ и $[ДХЭ]$ – концентрации холина, $MXЭ_6$ и $ДХЭ_6$ соответственно. При этом, как свидетельствуют приведенные уравнения, сделано предположение об отсутствии нарушений конкурентности между $ДХЭ_6$, $MXЭ_6$ и холином.

Для получения доступной проверки зависимости концентрации продукта $[P]$ от времени t применен численный метод. Расчеты проведены с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003. Для получения кривой $[P] = f(t)$ взяты промежутки времени $\Delta t = \text{const}$, а их число составляет не менее 80 точек.

Наложение теоретической и экспериментальной кривых накопления кислотного продукта в зависимости от времени для полного (по двум сложноэфирным связям) ферментативного гидролиза $ДХЭ_6$ показано на рис. 1. Как видно из приведенного рис., начальный участок теоретической кривой тесно ложится на экспериментальную кривую. Однако теоретическая кривая изламывается значительно раньше экспериментальной. Как и следовало ожидать, излом на теоретической кривой соответствует точке $[P] \approx 3.0 \cdot 10^{-4}$ М (исходная концентрация $ДХЭ_6$), что является следствием большой разницы в реакционных способностях $ДХЭ_6$ и $MXЭ_6$ (соотношение $V_{\max(ДХЭ_6)}/K_{m(ДХЭ_6)}$ в 450 раза больше, чем соответствующая величина для $MXЭ_6$). В этой точке, согласно проведенным расчетам, $ДХЭ_6$ в реакционной среде должен быть полностью исчерпан, а концентрация $MXЭ_6$ максимальна и соответствует исходной концентрации $ДХЭ_6$. Из того же рис. видно, что теоретическая кривая, описывающая вторую стадию, вполне приемлемо воспроизводит экспериментальную зависимость. Эти результаты подтверждают, что использованные нами для расчетов кинетические параметры достаточно хорошо описывают течение реакции в тех участках, где соблюдаются чисто конкурентные отношения между реагирующими веществами.

Из приведенных данных очевидно также, что нарушение конкурентности наблюдается на первой стадии реакции. Нами была рассчитана кривая $[P] = f(t)$ для первой стадии формально допуская, что $[ДХЭ_6]_0 = 4.2 \cdot 10^{-4}$ М, что соответствует концентрации продукта на экспериментальной кривой в точке излома. Согласно полученным результатам, теоретическая зависимость вполне удовлетворительно описывает эксперимент. Этот результат указывает на то, что нарушение конкурентности не оказывает существенного влияния на кинетику реакции и отражается на количестве образующихся кислотных продуктов. Рассмотрение материального баланса реагирующих веществ и их качественного состава показывает, что дополнительный прирост кислотного продукта на первой стадии обусловлен образованием $ДК_6$.

Для объяснения совокупности полученных данных нами сделано предположение, что комплекс Михаэлиса $[EuДХЭ_6]$ после гидролиза одной из эфирных связей переходит в комплекс $[EuMXЭ_6\text{холин}]$, который частично распадается или образуя свободный фермент, $MXЭ_6$ и холин, или свободный фермент, $ДК_6$ и холин. Именно второй путь распада и приводит

к нарушению конкурентных отношений между ДХЭ₆ и МХЭ₆. В данном случае, исходя из концентрации в точке излома экспериментальной кривой, можно сделать предположение, что приблизительно 0.4 часть [Е₀ДХЭ₆ихолин] комплексов приводит к образованию ДК₆.

Таким образом, предложенную нами упрощенную схему первой стадии ферментативного гидролиза ДХЭ₆ можно представить следующим образом (схема 1), где взаимопревращение комплексов Михаэлиса включено в большие квадратные скобки.

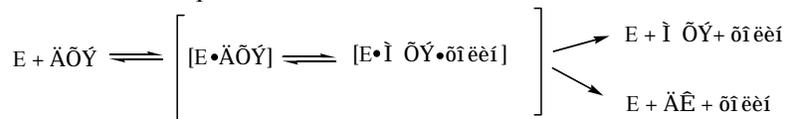


Схема 1. Вероятная схема механизма первой стадии ферментативного гидролиза ДХЭ₆ под действием БХЭ₁ (Е – фермент).

Автор выражает благодарность проф. Алебяну Г.П. и Папоян А.О. за обсуждение и ценные советы при работе над статьей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алебян Г.П.* Автореф. канд. дисс., Ленинград, Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова АН СССР, 135 с., 1978.
2. *Алебян Г.П., Григорян Н.А., Мнджоян О.Л., Самокиш В.А.* Биоорганическая химия, 3, 1266-1272, 1977.
3. *Алебян Г.П., Мнджоян О.Л., Самокиш В.А.* Биотехнология, 1, 80-85, 1999.
4. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты, М., Мир, 1966 [Dixon M., Webb E. Enzymes. 2nd edn Longmans Green, London, 1964].
5. Дитилин и опыт его клинического применения. *Под ред. Мнджояна А. Л.* Изд-во АН АрмССР, Ереван, 251 с., 1957.
6. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства, 2, М., "Новая Волна", 2002.
7. *Мнацаканян М.Р., Акопян Л.М., Саркисян Ж.В., Самокиш В.А., Алебян Г.П.* Биолог. журн. Армении, 59, 3-4, 239-247, 2007.
8. *Мнацаканян М.Р., Папоян А.О., Самокиш В.А., Алебян Г.П.* Хим. ж. Армении, 62, 1-2, 188-200, 2009.
9. *Brucke F.* Pharmacological reviews, 8, 256-335, 1956.
10. *Giacobini E.* Neurochemical research, 28, 3-4, 515-522, 2003.
11. *Grygoryan H., Halebyan G., Lefebvre B., Brasme B., Masson P.* Biochimica et Biophysica Acta, 1784, 1818-1824, 2008.
12. *Law K.-Sh., Acey R. A., Smith C.R., Benton D.A., Soroushian S., Eckenrod B., Stedman R., Kantardjieff K.A., Nakayama N.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 355, 2, 371-378, 2007.
13. *Martinez A., Castro A.* Expert Opinion on Investigational Drugs, 15, 1-15, 2006.
14. *Masson P., Legrand P., Bartels C.F., Froment M.-Th., Schopfer L.M., Lockridge O.* Biochemistry, 36, 2266-2277, 1997.
15. *Naguib M., Samarkandi A., El-Din M.E., Abdullah K., Khaled M. Alharby S.W.* Anesth. Analg., 102, 151-155, 2006.
16. *Nordberg A., Svensson A.L.* Drug Safety, 19, 465-480, 1998.
17. *Tsuji F.J., Foldes F.F.* Fed. Proc. 12, 374, 1953.
18. *Whittaker V.P. and Wijesundera S.* Biochem. J., 52, 475-479, 1952.
19. *Xu Y., Colletier J.-P., Weik M., Jiang H., Moulton J., Silman I., Sussman J.L.* Biophysical Journal, 95, 2500-2511, 2008.

Поступила 07.05.2009.