

СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИСТОЧНИКОВ

Ю. Г. Жуковский
Л. П. Кузнецова
Е. Е. Сочилина
Е. Р. Никитина

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: zhuk@iephb.ru

Предложен способ идентификации отличий между ацетилхолинэстеразами из электрической ткани электрического ската и электрического угря и ацетилхолинэстеразами из эритроцитов человека, лошади и верблюда. Способ основан на различиях в чувствительности холинэстеразного домена (каталитического центра) этих энзимов к некоторым обратимым фосфониевым ингибиторам.

Ключевые слова: идентификация, ацетилхолинэстераза, электрический угорь, электрический скат, фосфониевые ингибиторы.

При промышленном производстве холинэстераз и в лабораторной практике иногда возникает необходимость идентифицировать эти энзимы. Это может быть связано с нарушениями в процессе производства и хранения энзимов, а также при утрате маркировки готовой продукции.

Широко известны различные варианты способа идентификации типов холинэстераз путем сравнительной оценки их способности гидролизовать при оптимальных условиях холиновые эфиры «стандартного набора»: ацетилхолин, пропионилхолин, бутирилхолин и ацетил-β-метилхолин. Так, ацетилхолинэстеразы с наибольшей скоростью гидролизуют субстрат ацетилхолин, пропионилхолинэстеразы — субстрат пропионилхолин, бутирилхолинэстеразы — субстрат бутирилхолин, ацетил-β-метилхолинэстеразы — субстрат ацетил-β-метилхолин [1]. Этот способ позволяет идентифицировать типы холинэстераз, однако идентификация таким образом холинэстераз внутри одного типа малоэффективна, что прежде всего может быть обусловлено достаточно выраженной специфичностью холинэстераз одного типа.

Известен способ групповой дифференциации ацетилхолинэстераз от бутирилхолинэстераз путем сравнения чувствительности идентифицируемого энзима к различным ингибиторам [2]. Он дает возможность, например, отличить ацетилхолинэстеразу (АХЭ) эритроцитов лошади от бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) сыворотки крови лошади:

АХЭ намного более чувствительна к параоксону, чем к изопестоксу, а БуХЭ, наоборот, более чувствительна к изопестоксу, чем к параоксону.

Особенности каталитических свойств активного центра различных холинэстераз широко изучаются с использованием различных субстратов и ингибиторов [3]. Накоплен большой экспериментальный материал, анализ которого дает возможность приблизиться к решению вопроса об идентификации некоторых энзимов внутри одного типа. Большой интерес в этом отношении представляют обратимые ингибиторы холинэстераз.

В настоящей работе описан способ дифференциации ацетилхолинэстеразы из электрических рыб от ацетилхолинэстераз из других биологических источников (эритроциты человека, лошади и верблюда), основанный на различиях в чувствительности этих энзимов к обратимому ингибирующему действию некоторых фосфониевых соединений.

Материалы и методы

В работе в качестве субстрата использовали ацетилхолин и ацетилтиохолиниодиды (Chemapol, Чехия).

В качестве обратимых ингибиторов использовали пять фосфониевых соединений, синтез которых описан в работах [4–7]:

1. $(C_4H_9)_3 P^+ - CH_2CH_2CH_3 \cdot Br^-$;
2. $(C_4H_9)_3 P^+ - CH_2CH = CH_2 \cdot Br^-$;

3. $(C_6H_5)_3 P^+ - CH_2CH_2CH_3 \cdot Br^-$;
4. $(C_6H_5)_3 P^+ - CH_2CH = CH_2 \cdot Br^-$;
5. $(C_6H_5)_3 P^+ - CH_2C \equiv CH \cdot Br^-$.

Применяли частично очищенные лиофилизированные препараты ацетилхолинэстеразы (НФ 3.1.1.7) из электрического органа ската *Torpedo marmorata* (АХЭС) с удельной активностью (уд. А) 1 000 Е/мг и электрического угря *Electrophorus electricus* (АХЭУ) с уд. А 1 000 Е/мг (Sigma, США), из эритроцитов верблюда (АХЭВ) с уд. А 0,02 Е/мг, лошади (АХЭЛ) с уд. А 1,2 Е/мг и человека (АХЭЧ) с уд. А 6,1 Е/мг, изготовленные в Пермском НИИВС. Удельную активность препаратов определяли методом потенциометрического титрования с использованием в качестве субстрата 2 мМ ацетилхолина (25 °С; 0,1 М хлорид калия, рН 7,5). Скорость холинэстеразного гидролиза ацетилтиохолина в отсутствие и в присутствии ингибитора определяли фотометрическим методом Эллмана [8] при температуре 25 °С и рН 7,5. Реакционная смесь состояла из 1 мл 1 мМ раствора 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты) в 100 мМ фосфатном буфере (рН 7,5), 1 мл раствора энзима (0,2 Е/мл), 1 мл 0,5 М раствора хлорида калия, 1 мл воды в контрольной пробе или 1 мл раствора ингибитора в опытной пробе и затем 1 мл 2,5 мМ раствора ацетилтиохолина. С помощью фотоэлектроколориметра ФЭК-56 (светофильтр №3) измеряли время в секундах, за которое оптическая плотность реакционной смеси возрастает на величину 0,1 (t_k — в контрольном опыте без ингибитора, $t_{оп}$ — в опыте с ингибитором). Подбирали такую концентрацию ингибитора, при которой энзиматическая активность уменьшается вдвое, т.е. $t_{оп} / t_k = 2$.

Результаты и обсуждение

Идентификацию АХЭС и АХЭУ от АХЭВ, АХЭЛ и АХЭЧ осуществляют, сравнивая чувствительность этих энзимов к ингибирующему действию следующих двух соединений:

1. $(C_4H_9)_3 P^+ - CH_2CH_2CH_3 \cdot Br^-$;
2. $(C_4H_9)_3 P^+ - CH_2CH = CH_2 \cdot Br^-$.

С этой целью для каждого энзима подбирают концентрацию ингибитора (C_1 — для ингибитора 1 и C_2 — для ингибитора 2), уменьшающую энзиматическую активность в два раза ($t_{оп} / t_k = 2$). Полученные результаты представлены в табл. 1. Из них следует, что энзимы АХЭС и АХЭУ, выделенные из электрической ткани электрических рыб, резко отличаются от ацетилхолинэстераз, выделенных из других биологических источников: в опытах с АХЭС и АХЭУ величина C_1 значительно больше, чем величина C_2 , а в опытах с другими АХЭ, наоборот, C_1 значительно меньше, чем C_2 . Эта особенность АХЭС и АХЭУ позволяет проводить их идентификацию.

Идентификацию АХЭУ от АХЭВ, АХЭЛ и АХЭЧ осуществляют путем сравнения чувствительности этих энзимов к ингибирующему действию следующих трех соединений:

4. $(C_6H_5)_3 P^+ - CH_2CH_2CH_3 \cdot Br^-$;
5. $(C_6H_5)_3 P^+ - CH_2CH = CH_2 \cdot Br^-$;
6. $(C_6H_5)_3 P^+ - CH_2C \equiv CH \cdot Br^-$.

С этой целью для каждого энзима подбирают концентрацию ингибитора, которая уменьшает энзиматическую активность в два раза (C_4 — для ингибитора 4, C_5 — для ингибитора 5 и C_6 — для ингибитора 6). Затем вычисляют величины отношений C_5/C_6 , C_4/C_5 и C_4/C_6 и в том случае, если величина C_4/C_5 больше величины C_5/C_6 , но меньше величины C_4/C_6 , делают заключение, что идентифицируемым энзимом является АХЭУ.

Полученные результаты представлены в табл. 2. Величины отношений концентраций ингибиторов, уменьшающих активность ацетилхолинэстераз в 2 раза, приведены в табл. 3. Из них следует, что для АХЭУ величина C_4/C_5 больше величины C_5/C_6 , но меньше величины C_4/C_6 . Для АХЭВ, АХЭЛ и АХЭЧ величина C_4/C_5 меньше не только величины C_4/C_6 , но и величины C_5/C_6 .

Таким образом, использование предложенных методов позволяет надежно идентифицировать ацетилхолинэстеразы электрических рыб и ацетилхолинэстеразы, выделенные из других биологических источников.

Таблица 1. Концентрации ингибиторов 1 и 2, при которых энзиматическая активность снижается в 2 раза ($t_{оп}/t_{к} = 2$) (Погрешность 10% ; $n = 5$; $P = 0,95$)

№	Ингибитор	Концентрация ингибитора, мкМ, при которой $t_{оп}/t_{к} = 2$				
		АХЭУ	АХЭС	АХЭВ	АХЭЛ	АХЭЧ
1	$(C_4H_9)_3P^+ - CH_2CH_2CH_3 \cdot Br^-$	320	62	250	240	58
2	$(C_4H_9)_3P^+ - CH_2CH=CH_2 \cdot Br^-$	27	30	310	380	96

Таблица 2. Концентрации ингибиторов 4, 5 и 6, при которых энзиматическая активность снижается в 2 раза ($t_{оп}/t_{к} = 2$) (Погрешность 10% ; $n = 5$; $P = 0,95$)

№	Ингибитор	Концентрация ингибитора, мкМ, при которой $t_{оп}/t_{к} = 2$				
		АХЭУ	АХЭС	АХЭВ	АХЭЛ	АХЭЧ
4	$(C_6H_5)_3P^+ - CH_2CH_2CH_3 \cdot Br^-$	200	80	150	50	200
5	$(C_6H_5)_3P^+ - CH_2CH=CH_2 \cdot Br^-$	90	60	150	40	90
6	$(C_6H_5)_3P^+ - CH_2C \equiv CH \cdot Br^-$	50	40	84	21	50

Таблица 3. Величина отношений концентраций ингибиторов 4, 5 и 6, уменьшающих активность ацетилхолинэстераз в 2 раза

Энзим	Отношение концентраций ингибиторов		
	C_5/C_6	C_4/C_5	C_4/C_6
АХЭУ	1,2	3,8	4,5
АХЭВ	1,6	1,3	2,0
АХЭЛ	1,8	1,0	1,8
АХЭЧ	1,8	1,4	2,5

ЛИТЕРАТУРА

1. *Usdin E.* Anticholinesterase agents. Intern. Encyclopedia Pharmac. Ther. — Pergamon Press, 1970. — V. 1. — P. 133.
2. *Aldridge W. N.* The differentiation of true and pseudo cholinesterase by organophosphorus compounds // *Biochem. J.* — 1953. — V. 53, N 1. — P. 62–67.
3. *Бресткин А. П., Кузнецова Л. П., Моралёв С. Н. и др.* Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. — Владивосток: ТИПРО-центр, 1997. — 466 с.
4. *Органикум.* Практикум по органической химии / Пер. с нем. Потапова В. М. и Пономарёва С. В. — М.: Мир, 1979. — Т. 1. — С. 277–278.
5. *Пат. 1160855* Германии, СА 609313 (1964).
6. *Keough P. T. and M. Grayson.* Phosphonio-ethylation. Michael addition to vinylphosphonium salts // *J. Org. Chem.* — 1964. — V. 29, N3. — P. 631–635.
7. *Wittig G., Schollkopf U.* Uber Triphenyl-phosphin-methylene als olefinbildende Reagenzien (I. Mitteil. // *Chem. Ber.* — 1954. — V. 87, N9. — P. 1318–1330.
8. *Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., Featherstone R. M.* / A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // *Biochem. Pharmacol.* — 1961. — V. 7, N 1. — P. 88–95.

**СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ
АЦЕТИЛХОЛІНЕСТЕРАЗ
ІЗ РІЗНИХ БІОЛОГІЧНИХ ДЖЕРЕЛ**

*Ю. Г. Жуковський
Л. П. Кузнецова
Е. Е. Сочиліна
Е. Р. Нікітіна*

Інститут еволюційної фізіології і біохімії
ім. І. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Росія

E-mail: zhuk@iephb.ru

Запропоновано спосіб ідентифікації відмінностей між ацетилхолінестеразами з електричної тканини електричного ската і електричного вугра та ацетилхолінестеразами з еритроцитів людини, коня і верблюда. Спосіб заснований на відмінностях у чутливості холінестеразного домену (каталітичного центру) цих ензимів до деяких оборотних фосфонієвих інгібіторів.

Ключові слова: ідентифікація, ацетилхолінестераза, електричний вугор, електричний скат, фосфонієві інгібітори.

**METHOD FOR IDENTIFICATION
OF ACETYLCHOLINESTERASES
FROM VARIOUS BIOLOGICAL SOURCES**

*Yu. G. Zhukovskii
L. P. Kuznetsova
E. E. Sochilina
E. R. Nikitina*

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology
and Biochemistry,
Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

E-mail: zhuk@iephb.ru

The method for identification differences between acetylcholinesterases of the electric organs of the eel *Electrophorus electricus* and the electric ray *Torpedo marmorata* and ones from human, horse and camel erythrocytes was suggested. The method is based on different sensitivity of cholinesterase domen (catalytic centre) of there enzymes to some phosphonium reversible inhibitors.

Key words: identification, acetylcholinesterase, electric eel, electric ray, phosphonium inhibitors.