

АКТИВНОСТЬ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ОКТАНОЛА

Л. П. Кузнецова
Е. Р. Никитина
Е. Е. Сочилина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова»
Российской академии наук, Санкт-Петербург

E-mail: esoch@iephb.ru

Получено 23.04.2013

Препараты бутирилхолинэстеразы из сыворотки крови лошади широко используют в исследовательских целях и в качестве аналитического реагента для определения биологически активных веществ. Особенно важна высокая чувствительность бутирилхолинэстеразы к фосфорорганическим ингибиторам, обладающим высокой токсичностью для теплокровных.

Исследовано влияние октанола на каталитическую активность бутирилхолинэстеразы из сыворотки крови лошади относительно субстратов бутирилхолина и α -нафтилацетата и на ее чувствительность к диизопропилфторфосфату. Активность бутирилхолинэстеразы в опытах с бутирилхолином измеряли методом потенциометрического титрования, а в опытах с α -нафтилацетатом — флуорометрическим методом, позволяющим определять скорость гидролиза низких концентраций субстрата. Показано, что октанол не влияет на каталитическую активность энзима относительно специфического субстрата бутирилхолина, но ускоряет энзиматический гидролиз неспецифического субстрата α -нафтилацетата и снижает чувствительность энзима к ингибирующему действию диизопропилфторфосфата. Полученные результаты имеют важное практическое значение, поскольку октанол применяют на некоторых производствах в качестве пеногасителя. Как показали наши исследования, такие стандартные процедуры, используемые при производстве препаратов энзимов из исходного сырья, как высаливание и обессоливание, только частично удаляют примесь октанола. Полностью отделить энзим от октанола и тем самым восстановить его чувствительность к диизопропилфторфосфату удалось избирательной сорбцией энзимного протеина на ионообменной смоле с последующей элюцией солевым раствором.

Ключевые слова: бутирилхолинэстераза сыворотки крови лошади, бутирилхолин, α -нафтилацетат, диизопропилфторфосфат, октанол, активация, ингибирование.

Промышленный выпуск препаратов бутирилхолинэстеразы из плазмы крови лошади (БуХЭ) уже давно освоен как в нашей стране, так и за рубежом. Их широко используют в исследовательских целях и в качестве аналитического реагента для определения биологически активных веществ, являющихся ингибиторами этого энзима [1]. Особенно важной характеристикой препаратов БуХЭ является их чувствительность к фосфорорганическим ингибиторам (ФОИ).

Известно, что на реакционную способность БуХЭ существенное влияние могут оказывать различные эффекторы. Ранее нами было показано, что некоторые азотсодержащие детергенты ускоряют гидролиз α -нафтилацетата под действием этого энзима [2]. Имеются данные о том, что низшие члены гомологического ряда алифатических спиртов с длиной цепи атомов углерода 1–4 снижают чувствительность БуХЭ

к фосфорорганическим ингибиторам [3–5]. Спирты с длиной цепочки 7–10 атомов углерода имеют очень низкую растворимость в воде, и их влияние на БуХЭ практически не изучали. Тем не менее, при производстве БуХЭ в качестве пеногасителя допускается применение октилового спирта.

Целью работы было изучение влияния октилового спирта на реакционную способность БуХЭ. Действие октанола исследовали на образцах препаратов БуХЭ с разной степенью очистки энзима в реакциях ингибирования необратимым фосфорорганическим ингибитором диизофторфосфатом и гидролиза субстратов бутирилхолина и α -нафтилацетата.

Материалы и методы

В качестве энзимов использовали препараты бутирилхолинэстеразы из сыворотки крови лошади (БуХЭ, ацилхолин ацилгид-

ролаза, НФ 3.1.1.8) с различной степенью очистки: образец I — удельная активность 4,6 Е/мг протеина; образец II — 20,3 Е/мг протеина; образец III — 410 Е/мг протеина. Препараты БуХЭ изготовили по известной технологии [1, 2]. В качестве субстратов использовали бутирилхолин (БХ; Chemapol, Чехия) и α -нафтилацетат (НА; Aldrich, США), в качестве эффекторов — диизопропилфторфосфат (ДФФ, Sigma-Aldrich, США) и октиловый спирт (1-октанол, Sigma-Aldrich, США).

Растворимость октанола в воде очень мала и составляет 0,056% [6]. С целью имитации процесса пеногашения в водный раствор энзима добавляли октанол в избыточном количестве (1% об.). Смесь интенсивно перемешивали в течение 10 мин и отстаивали в делительной воронке, затем энзимосодержащую водную фазу отделяли от избытка октанола, скопившегося на поверхности, и использовали для дальнейших исследований. Перед добавлением октанола растворы препаратов энзима с разной удельной активностью разбавляли дистиллированной водой с таким расчетом, чтобы активность БуХЭ (по БХ) была примерно одинаковой.

Скорость холинэстеразного гидролиза БХ в контрольном опыте (без октанола) и в опытной пробе (с октанолом) определяли методом потенциометрического титрования [1] и выражали в ЕА(БХ)/мл. За единицу активности энзима ЕА(БХ) принимали 1 мкмоль бутирилхолина, превращаемый энзимом за 1 мин. Измерения проводили при температуре $25,00 \pm 0,05$ °С в 50 мМ трис-НСl-буфере, рН $7,50 \pm 0,05$, с 10 мМ БХ.

Скорость холинэстеразного гидролиза флуорогенного субстрата НА в контрольном опыте (без октанола) и в опытной пробе (с октанолом) определяли при малых степенях превращения субстрата (до 5%) по скорости нарастания интенсивности флуоресценции продукта гидролиза α -нафтола [7]. Измерения выполняли в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при температуре $25,00 \pm 0,05$ °С в трис-НСl-буфере, рН $7,50 \pm 0,05$, в интервале концентраций НА от $5 \cdot 10^{-5}$ до $4 \cdot 10^{-4}$ М. Активность энзима выражали в условных единицах (усл. ед.). Одна условная единица соответствовала увеличению интенсивности флуоресценции реакционной смеси на одно деление шкалы самописца за единицу времени. Поскольку НА не является специфическим субстратом БуХЭ, его гидролиз может осуществляться неспецифическими эстеразами. Известно, что они обладают меньшей чувствительностью

к ДФФ по сравнению с холинэстеразами. Для определения доли гидролиза НА, проходящей на неспецифические эстеразы, мы провели измерение скорости его гидролиза до и после 10-минутной инкубации образцов энзима I, II и III с ДФФ. Минимальную концентрацию ДФФ подбирали таким образом, чтобы остаточная активность БуХЭ (по БХ) равнялась нулю. Измерения показали, что доля неспецифических эстераз для образцов БуХЭ I и II составляет не более 3%, а для образца III — менее 0,5%, и их влиянием на скорость энзиматического гидролиза НА можно пренебречь.

Ингибирование БуХЭ под действием ДФФ в контрольном опыте (без октанола) и в опытной пробе (с октанолом) проводили при тех же условиях (рН $7,50 \pm 0,05$, температура $25,00 \pm 0,05$ °С в трис-НСl буфере). В опытах с субстратом БХ после инкубации энзима с ингибитором в течение заданного времени добавляли раствор БХ до конечной концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ М и измеряли потенциометрически остаточную активность БуХЭ. Чувствительность БуХЭ к ДФФ оценивали по величине бимолекулярной константы k_{II} , которую вычисляли по уравнению для псевдомономолекулярной реакции: $k_{II} = \ln(v_0 / v_t) / ([I] \cdot t)$, где $[I]$ — молярная концентрация ингибитора в реакционной смеси с энзимом; v_0 и v_t — начальные скорости холинэстеразного гидролиза субстрата в отсутствие и в присутствии ингибитора, соответственно; t — время взаимодействия энзима с ингибитором (мин) до момента добавления субстрата [1].

В опытах с НА взаимодействие БуХЭ с ДФФ оценивали по величине константы скорости реакции первого порядка K_I , которую определяли непосредственно в ходе ингибирования энзима по разработанной в нашей лаборатории методике. Для того чтобы влияние субстрата как конкурента ингибитора было минимальным, его концентрация в реакционной смеси была существенно меньше по сравнению с K_m и составляла в контрольных опытах $1 \cdot 10^{-5}$ М ($K_m = 2,3 \cdot 10^{-4}$ М), а в опытах с октанолом — $3 \cdot 10^{-6}$ М ($K_m = 5,3 \cdot 10^{-5}$ М). Величину K_I находили путем математической обработки кривой накопления α -нафтола в присутствии определенной концентрации ингибитора [8]. Для сопоставления с данными, полученными в опытах с БХ, по начальному участку этой кривой, где сохраняется пропорциональность K_I и $[I]$, вычисляли величину бимолекулярной константы по формуле:

$$k_{II} = K_I / [I].$$

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием t -критерия Стьюдента. Константу Михаэлиса (K_m) и предельную скорость энзиматического гидролиза НА (V) находили графическим методом Лайнуивера-Берка [1] в режиме программы *Microsoft Excel*.

Результаты и обсуждение

Влияние октанола было исследовано на образцах энзима разной степени очистки. В табл. 1 представлены результаты измерений активности растворов разных образцов БУХЭ по отношению к БХ и НА в контрольных опытах (без октанола) и после обработки октанолом. Данные показывают, что присутствие октанола в образцах энзима разной степени очистки не оказывает влияния на скорость гидролиза БХ, но увеличивает в 4–5 раз по сравнению с контролем скорость гидролиза НА. Поскольку степень активации октанолом холинэстеразного гидролиза НА была практически одинаковой для образцов с разной удельной активностью, для дальнейших опытов использовали только препарат II. На рисунке в координатах Лайнуивера-Берка представлены графики зависимости скорости гидролиза НА от его концентрации под действием БУХЭ (образец II) в контрольном опыте и в присутствии октанола. Пересечение прямых в одной точке на оси ординат указывает на отсутствие влияния октанола на предельную скорость реакции, а точки пересечения с осью абсцисс ($-1/K_m$) показывают, что в присутствии октанола величина K_m уменьшается в четыре раза — с $2,3 \cdot 10^{-4}$ М до $5,3 \cdot 10^{-5}$ М, что и обуславливает эффект активации.

Обработка раствора энзима октанолом снижает скорость ингибирования БУХЭ под действием ДФФ: величина k_{II} в опытах

Таблица 1. Влияние октанола на активность энзима препаратов бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади по отношению к бутирилхолину (БХ) и нафтацетату (НА) ($M \pm m, n = 7$)

Образец препарата	А(БХ), ЕА/мл		А(НА), усл. ед./мл	
	контроль	октанол	контроль	октанол
I	1,7±0,1	1,7±0,1	5,8±0,3	24,3±1,2*
II	1,9±0,1	1,9±0,1	4,2±0,2	21,2±1,1*
III	1,8±0,1	1,8±0,1	5,5±0,3	25,9±1,4*

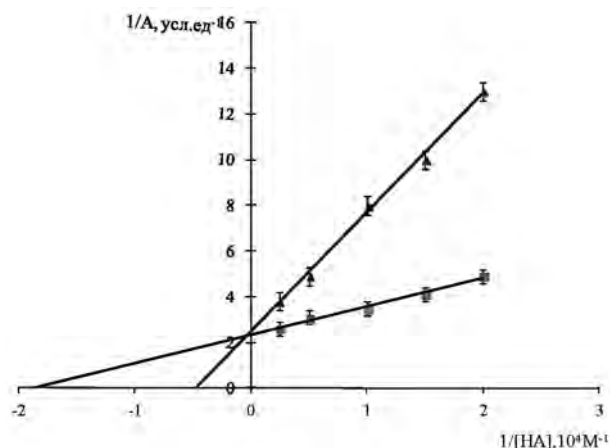
Примечание. Здесь и далее: * — различие достоверно относительно контроля ($P < 0,05$).

с октанолом в 10 раз меньше величины k_{II} в контрольном опыте (табл. 2). Следует отметить, что величины k_{II} , полученные разными методами с помощью разных субстратов — БХ и НА, совпадают как в контрольных опытах, так и в опытах с октанолом в пределах ошибки эксперимента.

Для удаления октанола из раствора энзима были испытаны следующие способы: пересаживание протеина энзима сульфатом аммония (СА), гель-фильтрация раствора энзима на сефадексе G-25 и сорбция протеина энзима на ионообменной смоле. Активность энзима контролировали с помощью субстрата НА. Исходные растворы БУХЭ готовили таким образом, чтобы они имели одинаковую активность по БХ. Полученные результаты представлены в табл. 2. Из них следует, что пересаживание энзима с помощью сульфата аммония лишь частично снижает влияние октанола в препаратах. Гель-фильтрация через сефадекс G-25 также не полностью исключает влияние октанола. Единственным эффективным способом, позволяющим полностью избавиться от влияния октанола, является осаждение энзима на ионообменном носителе, промывка сорбента значительным объемом буферного раствора и последующая элюция энзима солевым раствором. После обессоливания удается полностью восстановить чувствительность энзима к ДФФ и устранить активацию гидролиза НА.

Несмотря на низкую растворимость, октанол, являясь обратимым эффектором, влияет на реакционную способность БУХЭ относительно НА и ДФФ. Следует иметь в виду, что растворимость неполярных гидрофобных органических соединений в растворах протеинов может повышаться за счет комплексообразования с протеинами. Однако одинаковое изменение реакционной способности БУХЭ по отношению к НА для образцов с разной степенью очистки энзима, существенно различающихся по концентрации протеина, свидетельствует о высокой вероятности комплексообразования октанола именно с протеином энзима. Кроме того, на специфичность комплексообразования указывает то, что величина бимолекулярной константы скорости взаимодействия энзима с ДФФ в присутствии октанола не зависит от природы субстрата (НА или БХ), с помощью которого определяется остаточная активность.

Таким образом, приведенные данные показывают, что октанол, несмотря на край-



Влияние октанола на скорость гидролиза нафтилацетата (НА) бутирилхолинэстеразой сыворотки крови лошади (образец II):

▲ — в отсутствие и ■ — в присутствии октанола ($M \pm m, n = 5$)

Таблица 2. Величина константы скорости ингибирования (k_{II}) бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади (образец II) под действием ДФФ при различных способах удаления октанола из раствора энзима ($M \pm m, n = 7$)

Способ обработки образца	А(НА), усл. ед./мл	$k_{II}, 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	
		субстрат НА	субстрат БХ
Контрольный раствор	$3,1 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,6$	$5,9 \pm 0,6$
Обработка октанола	$15,5 \pm 0,7^*$	$0,6 \pm 0,1^*$	$0,6 \pm 0,1^*$
Переосаждение СА	$8,8 \pm 0,4^*$	$1,5 \pm 0,2^*$	$1,4 \pm 0,2^*$
Сефадекс G-25	$4,7 \pm 0,2^*$	$4,8 \pm 0,5^*$	$4,5 \pm 0,4^*$
ДЕАЕ-целлюлоза	$3,1 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,6$	$5,7 \pm 0,5$

не низкую растворимость в воде, способен оказывать влияние на реакционную способность БуХЭ и, в частности, замедлять скорость взаимодействия с ДФФ. Полное отделение октанола при изготовлении серийных

образцов БуХЭ имеет важное практическое значение, поскольку даже следовые количества октанола могут привести к нежелательному уменьшению чувствительности препаратов энзима к ФОИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жуковский Ю. Г., Кривченко А. И., Кузнецова Л. П., Сочили́на Е. Е. Ферменты холинэстеразы в здравоохранении (в медицине и экологическом мониторинге). — Орел: «А. В.», 2010. — 236 с.
2. Жуковский Ю. Г., Кузнецова Л. П., Сочили́на Е. Е. Особенности взаимодействия некоторых катионных детергентов с холинэстеразой сыворотки крови лошади // Укр. биохим. журн. — 1995. — Т. 67, № 4. — С. 40–46.
3. Розенгарт Е. В., Басова Н. Е. Влияние алифатических спиртов и pH на различные виды реакционной способности сывороточной холинэстеразы // Докл. АН РАН. — 2006. — Т. 407, № 4. — С. 550–555.
4. Бресткин А. П., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В. Влияние некоторых органических раство-
5. Fekonja O., Zorec-Karlovsek M., El Kharbili M. et al. Inhibition and protection of cholinesterases by methanol and ethanol // J. Enz. Inhib. Med. Chem. — 2007. — V. 22, N 4. — P. 407–415.
6. Справочник по растворимости. — М.–Л.: АН СССР, ВИНТИ, 1961. — Т. 1, Кн. 1. — С. 70.
7. Алебян Г. П., Бресткин А. П., Самокиш В. А. Тройные комплексы в реакциях, катализируемых бутирилхолинэстеразой // Биоорг. химия. — 1982. — Т. 8, № 4. — С. 478–486.
8. Бресткин А. П., Лапицкий К. В., Самокиш В. А., Смирнов О. И. К определению кинетических параметров двухстадийных бимолекулярных реакций // Докл. АН СССР. — 1974. — Т. 219, № 4. — С. 999–1002.

**АКТИВНІСТЬ
БУТИРИЛХОЛІНЕСТЕРАЗИ СИРОВАТКИ
КРОВІ КОНЯ ПІД ВПЛИВОМ ОКТАНОЛУ**

*Л. П. Кузнецова
Є. Р. Нікітіна
Є. Е. Сочиліна*

Федеральна державна бюджетна наукова
установа «Інститут еволюційної фізіології
та біохімії ім. І. М. Сеченова»
Російської академії наук, Санкт-Петербург

E-mail: esoch@iephb.ru

Препарати бутирилхолінестерази із сироватки крові коня широко використовують у дослідницьких цілях і як аналітичний реагент для визначення біологічно активних речовин. Особливо важливою є висока чутливість бутирилхолінестерази до фосфорорганічних інгібіторів, що мають високу токсичність для теплокровних.

Досліджено вплив октанолу на каталітичну активність бутирилхолінестерази із сироватки крові коня стосовно субстратів бутирилхоліну і α -нафтилацетату та на її чутливість до діізопропілфторфосфату. Активність бутирилхолінестерази в дослідках з бутирилхоліном вимірювали методом потенціометричного титрування, а в дослідках з α -нафтилацетатом — флюорометричним методом, що дає змогу визначати швидкість гідролізу малих концентрацій субстрату. Показано, що октанол не впливає на каталітичну активність ензиму стосовно специфічного субстрату бутирилхоліну, але прискорює ензиматичний гідроліз неспецифічного субстрату α -нафтилацетату і знижує чутливість ензиму до інгібітора діізопропілфторфосфату. Одержані результати мають важливе практичне значення, оскільки октанол застосовують на деяких виробництвах як піногасник. Як показали наші дослідження, такі стандартні процедури, що їх використовують у виробництві препаратів ензимів з вихідної сировини, як висолювання і знесолення, тільки частково видаляють домішки октанолу. Повністю відокремити ензим від октанолу і тим самим відновити його чутливість до діізопропілфторфосфату вдалося вибірковою сорбцією ензимного протеїну на іонообмінній смолі з подальшою елюцією сольовим розчином.

Ключові слова: бутирилхолінестераза сироватки крові коня, бутирилхолін, α -нафтилацетат, діізопропілфторфосфат, октанол, активація, інгібування.

**THE HORSE SERUM BUTYRYL-
CHOLINESTERASE ACTIVITY
UNDER OCTANOL INFLUENCE**

*L. P. Kuznetsova
E. R. Nikitina
E. E. Sochilina*

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

E-mail: esoch@iephb.ru

Butyrylcholinesterase preparations from horse blood serum widely use in the research purposes and as an analytical reagent for determination of biologically active substances. High sensitivity of butyrylcholinesterase to organophosphorous inhibitors which possess high toxicity for the warm-blooded is especially important.

Influence of octanol on reactive capacity of horse serum butyrylcholinesterase to butyrylcholine and α -naphthylacetate and on its sensitivity to diisopropylfluorophosphate is investigated. Enzyme activity measured by a method of potentiometric titration in experiments with butyrylcholine and a fluorimetric method in experiments with α -naphthylacetate allowing to define speed of hydrolysis of small concentration of a substrate. It is shown, that octanol does not influence on the hydrolysis rate of butyrylcholine but activates the enzymatic hydrolysis of α -naphthylacetate and reduces the sensitivity of enzyme to inhibition by diisopropylfluorophosphate. The received results have the important practical value as octanol apply in some manufactures in the capacity of a defoamer. Our researches have shown that such standard procedures which used by manufacture of enzyme preparations as salting-out and desalting only partially delete an octanol impurities. Complete separation of the enzyme from octanol and its sensitivity reduction to diisopropylfluorophosphate was possible by selective sorption of enzyme protein on the ion-exchange resin with the after-elution by a salt solution.

Key words: horse serum butyrylcholinesterase, butyrylcholine, α -naphthylacetate, octanol, diisopropylfluorophosphate, activation, inhibition.