



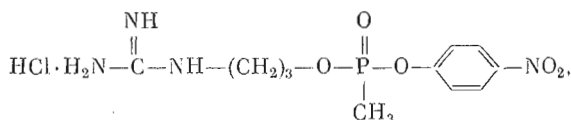
УДК 557.153.2.02

ВОДОРАСТВОРИМЫЙ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОР ДЛЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ

Сикк П. Ф., Оза А. В., Аавиксаар А. А.

Институт кибернетики Академии наук ЭССР, Таллин

В литературе показано [1-3], что фосфорорганические ингибиторы сериновых гидролаз подавляют активность панкреатической липазы только в состоянии эмульсии или в присутствии мицелл поверхностно-активных соединений (желчных солей). В настоящей работе синтезировано новое фосфорорганическое соединение — хлоридрат *O*-(3-гуанидинопропил)-*n*-нитрофенилметилфосфоната (ГПФ)



которое из истинного раствора необратимо подавляет активность липазы поджелудочной железы свиньи по отношению к трибутирину (в эмульсии).

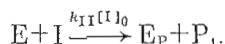
Реакция липазы с избытком фосфорорганического ингибитора ($[I]_0 \gg \ll [E]_0$) имеет первый порядок и сопровождается выделением *n*-нитрофенола. При этом константы скорости первого порядка, k_I , рассчитанные по уменьшению активности липазы и по выделению хромогенного продукта реакции, *n*-нитрофенола, совпадают в пределах погрешности эксперимента (рисунок, б). Исходя из этого, синтезированный нами ингибитор можно рекомендовать как удобный водорастворимый титрант для определения концентрации активных центров (операционной нормальности) липазы в растворе.

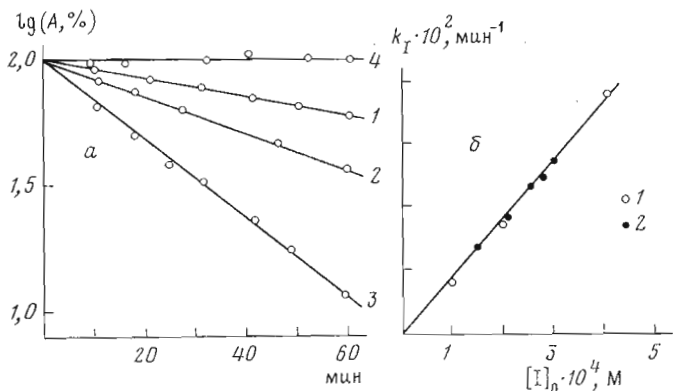
Бимолекулярная константа скорости ингибирования активности липазы, рассчитанная из зависимости k_I от $[I]_0$, составляет $1,50 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ (25° , pH 7,5; 0,04 М Na-веронал-HCl-буферный раствор, 0,5-1,25% ацетонитрила по объему).

Константы $k_I = k_{II} [I]_0$ были найдены из зависимостей $\lg(A, \%)$ от времени (рисунок, а), соответствующих уравнению

$$\lg(A, \%) = 2 - \frac{k_{II} [I]_0}{2,303} t,$$

согласно формальной схеме реакции





Ингибирование хлоргидратом *O*-(3-гуанидинопропил)-*n*-нитрофенилметилфосфоната гидролиза трибутирина (I) под действием панкреатической липазы (25°, pH 7,5; 0,04 M Na-веронал-HCl-буферный раствор, 0,5–1,25% ацетонитрила по объему). *a* – зависимость остаточной активности липазы от времени при $[I]_0 \cdot 10^4$ 1,025 (1), 2,05 (2), 4,1 (3), 4,1 M, после предварительной обработки липазы *n*-нитрофенилацетатом (4); *b* – зависимость от концентрации ингибитора константы скорости первого порядка, определенной по остаточной активности липазы (1) и по выделению *n*-нитрофенола (2)

Фосфорилирование липазы не приводило к заметному уменьшению ее активности по отношению к раствору *n*-нитрофенилацетата (25°, pH 7,5; 0,04 M Na-веронал-HCl-буферный раствор, 4% ацетонитрила по объему). Исходя из этого, можно было бы допустить, что синтезированный нами ингибитор реагирует с остатком серина, близким к каталитическому центру липазы, предполагаемая модификация которого с диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом (E-600) из эмульсии или в присутствии мицелл привела к потере способности фермента сорбироваться на границе раздела фаз и реагировать с субстратами, имеющими объемистые алкильные радикалы [4, 5].

Нами, однако, показано, что ГПФ и E-600 реагируют с разными группами в молекуле липазы. Как известно, при взаимодействии липазы с раствором *n*-нитрофенилацетата кроме каталитического гидролиза субстрата в активном центре происходит медленное ацетилирование дополнительной группы фермента, несущественной для его каталитической активности как по отношению к раствору *n*-нитрофенилацетата, так и по отношению к эмульгированным субстратам [6]. В наших опытах после обработки липазы *n*-нитрофенилацетатом она перешла в форму, которая уже не теряла активность в присутствии ГПФ, но по-прежнему ингибировалась под действием E-600 в присутствии $1,25 \cdot 10^{-2}$ M таурохолата натрия (25°, pH 6,0; 0,1 M ацетатный буферный раствор). На основе этого можно заключить, что медленное ацетилирование липазы *n*-нитрофенилацетатом и фосфорилирование с помощью ГПФ, по всей вероятности, происходят в одном и том же реакционном центре, отличном от группы, которая модифицируется при реакции липазы с E-600.

Кроме обработки липазы *n*-нитрофенилацетатом, фермент можно защитить от ингибирующего действия ГПФ добавлением в реакционную смесь таурохолата натрия в концентрации, превышающей критическую концентрацию мицеллообразования этого соединения (опыты при 25°, pH 6,0 или 7,5, ацетатный или Na-веронал-HCl-буферные растворы, $1,25 \cdot 10^{-2}$ M раствор таурохолата натрия, $[I]_0 = 5 \cdot 10^{-4}$ M). При этом защитный эффект мицелл таурохолата нельзя объяснить уменьшением равновесной концентрации ГПФ в растворе в результате его включения в мицеллы детергента — в специальном опыте было показано, что добавление таурохолата натрия в концентрации $1,25 \cdot 10^{-2}$ M не приводит к уменьшению скорости необратимого ингибирования трипсина под действием ГПФ.

Реакция ингибирования под действием ГПФ не протекает также с так называемой быстрой липазой [7, 8], представляющей высокомолекулярный агрегат липазы, колипазы и фосфолипидов, содержащихся в поджелудочной железе [9] (опыты при 25°, pH 7,5; 0,04 М Na-веронал-HCl-буферный раствор, 5% ацетонитрила по объему).

Реакционный центр в молекуле липазы для взаимодействия с ГПФ в комплексе фермента с мицеллами желчных солей (см. [10, 11]) или в форме «быстрой» липазы, по всей вероятности, не доступен взаимодействию с этим фосфорорганическим ингибитором.

Предложенный в настоящей работе фосфорорганический ингибитор, который из истинного раствора подавляет активность липазы, может быть использован как новый инструмент для изучения строения активной поверхности и механизма действия этого фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Desnuelle P., Sarda L., Ailhaud G. (1960) *Biochim. et biophys. acta*, **37**, 570–574.
2. Maylié M. F., Charles M., Sarda L., Desnuelle P. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **178**, 196–204.
3. Maylié M. F., Charles M., Desnuelle P. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **276**, 162–175.
4. Chapus C., Sémériva M. (1976) *Biochemistry*, **15**, 4988–4991.
5. Антонов В. К., Гигодман Л. М., Ротанова Т. В., Нуцубидзе Н. Н. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 276–277.
6. Sémériva M., Chapus C., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **58**, 808–813.
7. Sarda L., Maylié M. F., Roger J., Desnuelle P. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **89**, 183–185.
8. Ramachandran S., Yip Y. K., Wagles S. R. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **12**, 201–205.
9. Schoor W. P., Melius P. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **187**, 189–192.
10. Borgström B., Donnér J. (1975) *J. Lipid Res.*, **16**, 287–291.
11. Donnér J., Spink C. H., Borgström B., Sjöholm J. (1976) *Biochemistry*, **15**, 5413–5417.

Поступило в редакцию
1.XII.1978

WATER-SOLUBLE ORGANOPHOSPHORUS INHIBITOR FOR PANCREATIC LIPASE

SIKK P. F., OSA A. V., AAVIKSAAR A. A.

Institute of Cybernetics, Academy of Sciences of the Estonian SSR, Tallinn

A new organophosphorus compound, O-(3-guanidinopropyl)-*p*-nitrophenyl methylphosphonate (GNP), has been synthesized and its reactions with porcine pancreatic lipase have been investigated. The solution of the compound irreversibly inhibited the activity of lipase against tributyrin emulsion and did not modify the activity of the enzyme in the reaction with *p*-nitrophenyl acetate. On the other hand, pretreatment of lipase with *p*-nitrophenyl acetate protected the enzyme from GNP inhibition. GNP did not inhibit the lipase activity in the presence of sodium taurocholate micelles, neither the activity of the «fast» lipase (noncovalent association of the enzyme with colipase and phospholipids). It was shown that GNP and O,O-diethyl-*p*-nitrophenyl phosphate (E-600) reacted with different groups in lipase molecule. GNP was recommended as a new chemical tool for elucidating the lipase mechanism and the active site structure.