



## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРОДСТВА НЕКОТОРЫХ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ К АКТИВНОМУ ЦЕНТРУ ХОЛИНЭСТЕРАЗ КИНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ И МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА

*Евреинов В. И., Семенова В. Н., Годовиков Н. Н.,  
Кабачник М. И.*

*Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва*

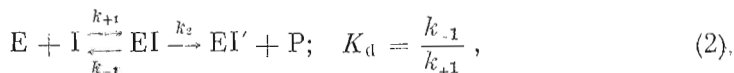
Предложен метод определения сродства необратимых фосфорорганических ингибиторов к активному центру холинэстераз (КФ 3.1.1.8), основанный на конкурентном вытеснении из активного центра высокоспецифичного флуоресцентного зонда — иодида N-метилакридиния. На примере четырех тиоэфиров кислот фосфора показано, что значения констант диссоциации обратимых фермент-ингибиторных комплексов, определенные кинетически и методом флуоресцентного зонда, удовлетворительно согласуются между собой. Обсуждаются различные кинетические схемы, применяемые в настоящее время для анализа процесса необратимого ингибирования холинэстераз; сделан вывод об условности разделения необратимых фосфорорганических ингибиторов на чисто необратимые и необратимые комбинированного типа действия.

Для оценки способности фосфорорганических ингибиторов необратимо подавлять ферментативную активность холинэстераз (КФ 3.1.1.8) обычно используют бимолекулярную константу скорости  $k_{II}$ , которая следует из формальной схемы

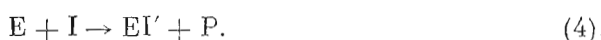
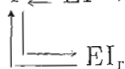


где  $EI'$  — фосфорилированный фермент,  $P$  — продукты реакции. Неоднократно отмечалось, что  $k_{II}$  не является характеристической константой и поэтому малопригодна для проведения количественных корреляций между структурой и ингибирующей способностью соединений рассматриваемого типа [1, 2].

Начиная с работ Мейна [1], не прекращались попытки описать процесс необратимого ингибирования холинэстераз в рамках схемы, аналогичной схеме Михаэлиса:



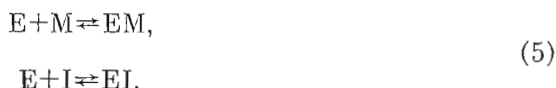
т. е. разделить этот процесс на две стадии: стадию образования обратимого фермент-ингибиторного комплекса  $EI$ , характеризующуюся константой диссоциации  $K_d$ , и стадию собственно фосфорилирования. В настоящее время для кинетического анализа необратимого ингибирования холинэстераз наряду со схемой (2) широко применяются схемы так называемого комбинированного торможения [3, 4], которые являются ее вариантами и предполагают существование непродуктивных обратимых комплексов  $EI_r$ :



На опыте те или иные кинетические константы определяются, как правило, с помощью тестирующей реакции, позволяющей следить за текущей концентрацией фермента, и, кроме того, реакция фермента с ингибитором и субстратом проводится в условиях псевдопервого порядка, т. е. при  $[E]_0 \ll [I]_0$  и  $[E]_0 \ll [S]_0$ .

Накопившийся экспериментальный материал вне зависимости от того, каким способом он был получен и в рамках какой кинетической схемы анализировался, а также современные теоретические представления показывают, что способность фосфорорганических ингибиторов подавлять активность холинэстераз очень сильно зависит от их сродства к активному центру. Поэтому разработка независимых (некинетических) методов определения способности необратимых ингибиторов к комплексообразованию представляет несомненный интерес как с точки зрения поиска количественных корреляций между их структурой и функцией, так и с точки зрения оценки справедливости тех или иных кинетических схем.

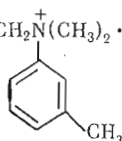
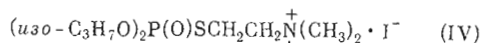
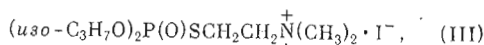
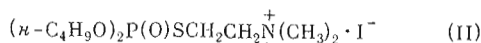
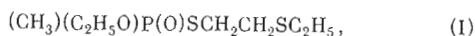
В настоящей работе развит метод флуоресцентного зонда (М) для определения  $K_d$  необратимых фосфорорганических ингибиторов. Этот метод основывается на конкурентном вытеснении флуоресцентного зонда из активного центра холинэстераз при введении ингибитора в равновесную систему «фермент — зонд» и подборе таких условий, при которых в начальные моменты времени может быть зафиксировано псевдоравновесное состояние, описываемое схемой (5), и когда, следовательно, можно пренебречь необратимой реакцией фосфорилирования фермента:



Можно показать, что в этом случае  $K_d$  ингибитора определяется выражением

$$K_d = {}^c K_d^M \frac{[M]_{\text{связ}}}{[M]_{\text{своб}}} \left[ \frac{[I]_0}{[E]_0 - [M]_{\text{связ}} (K_d^M / [M]_{\text{своб}} + 1)} - 1 \right], \quad (6)$$

где  $K_d^M$  — константа диссоциации комплекса зонда с ферментом,  $[M]_{\text{связ}}$  — концентрация связанного зонда,  $[M]_{\text{своб}}$  — концентрация зонда в растворе,  $[I]_0$  и  $[E]_0$  — исходные концентрации ингибитора и фермента в реакционной смеси. Экспериментальная проверка метода проведена на примере следующих тиоэфиров:



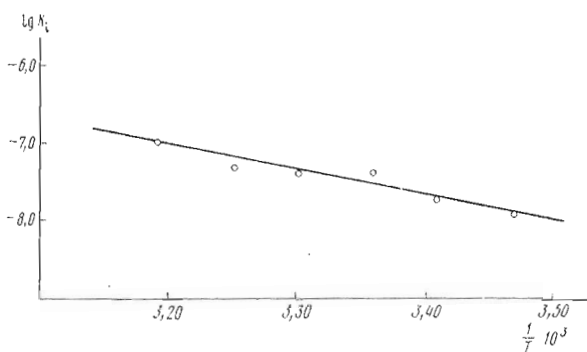


Рис. 1

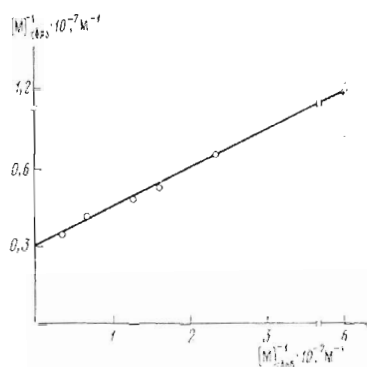


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость константы ингибирования бутирилхолинэстеразы иодидом N-метилакридиния от температуры

Рис. 2. Определение числа анионных центров и константы диссоциации обратимого фермент-ингибиторного комплекса иодида N-метилакридиния с пропионилхолинэстеразой

В работе использовали очищенные препараты пропионилхолинэстеразы из мозговой ткани с уд. акт. 400 Е и бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади с уд. акт. 8 Е (обе производства Пермского НИИ вакцин и сывороток). Полученные значения  $K_d$  для соединений (I—IV) сопоставлены с соответствующими константами, найденными с помощью модифицированного кинетического метода О'Брайна [5].

В качестве флуоресцентного зонда выбран иодид N-метилакридиния. Известно [6—10], что это соединение является сильным обратимым ингибитором холинэстераз; в случае холинэстераз КФ 3.1.1.8, к классу которых относится и пропионилхолинэстераза, иодид N-метилакридиния конкурентно ингибирует ферментативную реакцию с  $K_i \cdot 10^{-7} - 10^{-8}$  М, что указывает на высокое его сродство к активному центру фермента. Кроме того, это соединение обладает интенсивной флуоресценцией в водной среде ( $\lambda_{\text{возб}} \sim 360$  нм,  $\lambda_{\text{макс}} \sim 500$  нм, квантовый выход 0,75), но практически не флуоресцирует после комплексообразования, что позволяет легко определять концентрацию связывающих (анионных) центров в растворах холинэстераз. Равновесие между ферментом и флуоресцентным зондом характеризуется высокими значениями констант скорости прямой и обратной реакций, которые во многих случаях, по-видимому, существенно больше мономолекулярной константы скорости ( $k_2$ ) реакции фосфорилирования холинэстераз, что имеет определяющее значение при оценке сродства необратимых ингибиторов к ферменту предлагаемым методом ( $k_{+1} \sim 10^9$  М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup> и  $k_{-1} \sim 440$  с<sup>-1</sup> для ацетилхолинэстеразы электрического угря [9]).

В соответствии с литературными данными оказалось, что это соединение служит сильным конкурентным ингибитором обеих исследуемых холинэстераз. Анализ зависимости величины  $K_i$  бутирилхолинэстеразы ( $3,8 \cdot 10^8$  при 25° С) от температуры (рис. 1) позволил получить термодинамические характеристики процесса комплексообразования. Оказалось, что сорбция зонда на ферменте сопровождается выделением тепла ( $\Delta H^\circ - 25$  ккал/моль) и уменьшением энтропии системы более чем на 50 э.е.

В случае пропионилхолинэстеразы значения  $K_i$ , определенные при 25° С методами флуоресцентного (рис. 2) и потенциометрического титрования, оказались равными  $5 \cdot 10^{-8}$  и  $2 \cdot 10^{-8}$  М соответственно.

При определении сродства фосфорорганических ингибиторов к пропионилхолинэстеразе по вытеснению флуоресцентного зонда эксперименты проводились в условиях, когда концентрация активных центров (или

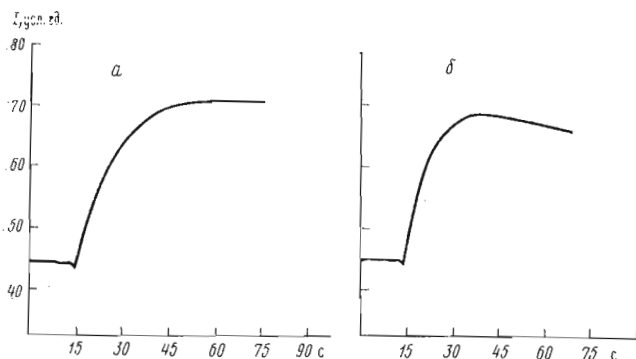


Рис. 3

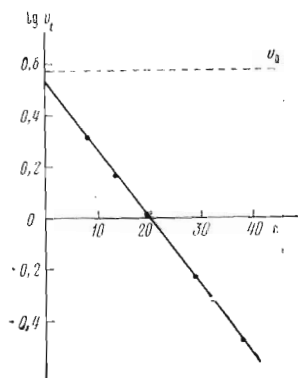


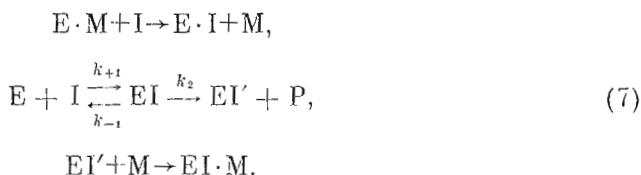
Рис. 4

Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресценции реакционной смеси после введения соединения (I) в концентрации 28,6 (а) и 57,5 мкМ (б)

Рис. 4. Определение констант ингибирования  $k_{11}$ ,  $K_d$  и  $k_2$  необратимых фосфорорганических ингибиторов по зависимости  $\lg v_t = f(t)$  (см. текст)

связывающих центров, что в нашем случае, как было показано независимыми титрованиями, совпадает в пределах ошибки опыта) близка к общей концентрации зонда в растворе. При этом абсолютные значения концентраций ( $\sim 10^{-7}$  М) определялись чувствительностью прибора, известной из литературы способностью иодида N-метилакридиния к фотохимическому превращению [11] и степенью очистки препарата фермента.

На рис. 3 приведены типичные кривые нарастания интенсивности флуоресценции, отражающие процесс конкуренции между зондом и ингибитором за активный центр пропионилхолинэстеразы при введении равновесную смесь фермента и зонда. Было показано, что начальная скорость «вытеснения» зонда, общий вид кривой (максимум или его отсутствие), а также максимальный прирост концентрации зонда в растворе определяются вводимым количеством ингибитора (незначительный начальный спад флуоресценции соответствует разбавлению реакционной смеси). Наблюдаемый характер изменения  $[M]_{\text{своб}}$  во времени, по-видимому, можно объяснить протеканием следующих процессов:



Если скорости фосфорилирования фермента невелики, т. е.  $k_2 < k_{+1}$  и  $k_2 < k_{-1}$ , то при некоторых концентрациях ингибитора новое равновесие между E, M и I установится быстрее, чем накопится сколько-нибудь заметное количество EI', способного вновь связывать «вытесненный» зонд. Такая ситуация должна соответствовать размытому максимуму на кривой  $[M]_{\text{своб}} = f(t)$ ; при повышении  $[I]_0$  следует ожидать более отчетливого выявления максимума. Именно такая картина и наблюдается на опыте. Отметим, что на способность фосфорилированных холинэстераз связывать иодид N-метилакридиния указывалось в литературе [7], однако константы диссоциации таких комплексов не определялись; в случае пропи-

**Параметры взаимодействия тиоэфиров с пропионилхолинэстеразой  
при 25°С**

Ингибитор	$k_{II}^* \cdot 10^{-7}$ (Флуор.)	$k_{II}^* \cdot 10^{-7}$ (потенц.)	$k_2/K_d \cdot 10^{-7}$	$k_2^{**}$ , мин <sup>-1</sup>	$K_d^{***} \cdot 10^6$ , М	$K_d^{***} \cdot 10^6$ (флуорим. титр.), М
	М <sup>-1</sup> ·мин <sup>-1</sup>					
(I)	0,017	0,042	0,021	23±8	110±24	70
(II)	4,1	5,3	6,2	31±8	0,5±0,15	0,1
(III)	0,25	0,52	0,42	13±8	3,0±2,0	0,5
(IV)	3,0	2,0	4,1	53±38	1,3±1,1	0,3

\* Бимолекулярные константы скорости реакции ингибирования пропионилхолинэстеразы, характеризующие общую ингибиторную способность тиоэфиров; определены флуориметрическим и потенциометрическим методами соответственно (см. текст).

\*\* Мономолекулярная константа скорости, отражающая фосфорилирующую способность тиоэфиров.

\*\*\* Константы диссоциации обратимых фермент-ингибиторных комплексов, определенные кинетически и методом флуоресцентного зонда соответственно; погрешность определения кинетических констант оценена по удвоенной среднеквадратичной ошибке среднего  $\bar{x} \pm 2s_{\bar{x}}$ .

онилхолинэстеразы способность EI' связывать флуоресцентный зонд подтверждена нами в независимых качественных опытах\*.

Таким образом, предельное значение [M]<sub>своб</sub> (рис. 3а) означает реализацию псевдоравновесных условий и дает возможность оценки  $K_d$  необратимого ингибитора в соответствии со схемой (5) и выражением (6). Полученные результаты суммированы в таблице. Результаты определения кинетических констант необратимых ингибиторов также приведены в таблице. Оценка общей ингибиторной способности потенциометрическим и флуориметрическим методами показывает, что значения  $k_{II}$  в обоих случаях близки между собой.

Однако если мы попытаемся определить тип ингибирования изученных соединений, то при использовании потенциометрического метода должны прийти к выводу, что соединения (I)–(IV) являются ингибиторами необратимого типа, а в случае флуориметрического метода все они — ингибиторы комбинированного типа действия. Это связано с тем, что на графике  $\lg v_i = f(t)$  наблюдаются отчетливо выраженные отсекаемые отрезки на оси ординат (рис. 4) и, кроме того, для некоторых тиоэфиров имеет место четкая зависимость  $k_{II}$  (флуор) от концентрации ингибитора\*\*. Такая ситуация отражает, на наш взгляд, известную условность деления необратимых фосфорорганических ингибиторов на чисто необратимые ингибиторы и необратимые ингибиторы комбинированного типа действия.

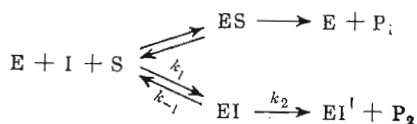
Выше отмечалось, что  $k_{II}$  не является характеристической константой и отражает лишь общую ингибиторную способность необратимых ингибиторов. В настоящее время кинетический анализ в рамках любого варианта схемы (2) позволяет в принципе выделить из  $k_{II}$  вклады, ответственные за связывание ( $K_d$  [1, 5],  $K_{1,s} = K_{1,r}$  [4], комбинацию  $K_d$  и  $K_{1,r}$  [3]) и фосфорилирование ( $k_2$  [1, 5], или в неявном виде  $k_a$  [4])\*\*\*. В рамках схе-

\* В недавно вышедшей работе Аугустинссона [21] отмечается, что фосфорилирование активного центра бутирилхолинэстеразы диизопропилфторфосфатом практически не влияет на средство подида N-метилакридинил к ферменту ( $K_d = 4,4 \cdot 10^{-8}$  М).

\*\* Для соединения (I) получено значение  $K_{1,r} = 2,3 \cdot 10^{-5}$  М и  $k_a = 3,0 \cdot 10^5$  М<sup>-1</sup> мин<sup>-1</sup> из зависимости  $k_{II}$  от [I]<sub>0</sub> по методу, описанному в [4].

\*\*\* Следует отметить, что авторы работы [4] при анализе схемы (4) предполагают сорбцию фосфорорганического ингибитора в активном центре фермента, приводящую к обратимому конкурентному торможению и реакции фосфорилирования, и реакции гидролиза субстрата (константы  $K_{1,s}$  и  $K_{1,r}$  соответственно). Однако при таком предположении эти константы имеют идентичный смысл и обязаны совпадать по величине. Расхождению между этими константами, обычно наблюдаемые на опыте, по-видимому, объясняются различиями в способах их определения. Отметим также, что константы  $K_d$  (схема 8) и  $K_{1,s}$  (схема 4) находятся с помощью одного и того же выражения (11); следовательно, в принципе  $K_d = K_{1,s} = K_{1,r}$ .

мы (2), в нашем конкретном случае схемы



$k_{II}$  определяется как отношение  $k_2/K_d$  [5]. Из таблицы видно, что величины  $k_{II}$ , определенные непосредственно и через отношение  $k_2/K_d$ , в пределах точности эксперимента совпадают.

Сопоставление значений  $K_d$  и  $k_2$  приводит к выводу об определяющей роли средства ингибитора к активному центру фермента, поскольку скорости реакции фосфорилирования во всех случаях практически одинаковы, т. е. для изученных соединений справедлив принцип «лучшее связывание — лучший катализ». Дополнительным аргументом в пользу такого вывода служат незначительные изменения констант щелочного гидролиза при широком варьировании R тиоэфиров  $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{C}_6\text{H}_4-\text{R})$  [12].

Сравнение значений констант диссоциации, приведенных в двух последних колонках таблицы, показывает, что два независимых метода дают вполне удовлетворительно согласующиеся результаты. Таким образом, предлагаемый метод определения  $K_d$ , основанный на конкурентном вытеснении флуоресцентного зонда из активного центра фермента, может быть использован для оценки средства необратимых фосфорорганических ингибиторов к холинэстеразам, несмотря на некоторые его ограничения. Более того, если известны значения констант прямой и обратной реакций образования комплекса с иодидом N-метиلاكридиния как для нативных, так и для фосфорилированных холинэстераз, то в принципе может быть проведен полный кинетический анализ кривых, приведенных на рис. 3, который позволит не только определить  $K_d = k_{-1}/k_{+1}$ , но и константы  $k_{+1}$ ,  $k_{-1}$  и  $k_2$ , описывающие взаимодействие фермента с необратимым ингибитором.

В заключение необходимо подчеркнуть, что результаты, полученные разными методами, однозначно указывают на преобладающий характер именно конкуренции необратимых фосфорорганических ингибиторов и субстратов за активный центр холинэстераз. Именно поэтому, на наш взгляд, описывая взаимодействие необратимых ингибиторов ферментом, следует придерживаться обычной схемы Михаэлиса, которая естественным образом учитывает процессы сорбции — десорбции ингибитора и его фосфорилирующую способность. Попытки разделения сорбции фосфорорганических ингибиторов на продуктивную и непродуктивную сорбцию (схемы (3) и (4) [3, 4]) не могут дать положительного результата в рамках традиционных экспериментальных подходов, поскольку кинетически эти стадии неразличимы. Поэтому разделение ингибиторов на чисто необратимые и обратимые комбинированного типа действия следует считать условным; по-видимому, те из них, которые обладают фосфорилирующей способностью по отношению к активному серину, действуют по единому механизму в рамках схемы Михаэлиса.

Тот факт, что с помощью потенциометрического метода для четырех изученных тиоэфиров не удалось зафиксировать образование обратимого комплекса (хотя два других независимых метода надежно показали его существование), по-видимому, можно объяснить самой методикой проведения опыта: фермент инкубируется с необратимым ингибитором в отсутствие субстрата, при этом в соответствии с его силой подбираются такие концентрации (далеко не всегда много превышающие концентрацию активных центров), чтобы обеспечить приемлемые времена инкубации; далее пробы фермента с ингибитором вносятся в реакционную смесь

с концентрацией субстрата, часто на много (5–7) порядков превышающую  $[I]_0$ ; естественно, что при этом необратимый ингибитор, даже обладающий высоким сродством к активному центру фермента, вытесняется субстратом и концентрация обратимого комплекса становится слишком малой, чтобы проявить себя в виде обратимого компонента.

### Экспериментальная часть

*Субстраты и ингибиторы.* Ацетилхолин хлористый (ч.) трижды перекристаллизовывали из смеси абс. этанол — абс. эфир;  $\alpha$ -нафтилацетат (ч.) дважды перекристаллизовывали из абс. этанола и трижды из гексана: т. пл. 44,0–44,3° С (ср. 46,0–46,3° С [13]). Иодид N-метилакридиния синтезировали по методике [7]; температура плавления после двукратной очистки переосаждением из смеси абс. метанол — абс. эфир составила 247° С (ср. 220–222 [14], 225–227 [6], 238,5–239,5° С [7] \*). Фосфорорганические тиоэфиры (I)–(IV) описаны ранее [15–17].

Растворы тиоэфиров и  $\alpha$ -нафтилацетата готовили растворением навесок в 96% этаноле, перегнанном над КОН; рабочие растворы готовили растворением аликвот в бидистиллированной воде, полученной перегонкой монодистиллята в кварцевой посуде в присутствии перекиси водорода [18]. Содержалис этанола в реакционных смесях не превышало 2,5%.

*Концентрацию активных центров* пропионилхолинэстеразы определяли методом Берри [19] с использованием соединения (II) в качестве титранта и ацетилхолина в качестве субстрата ( $1/15$  М фосфатный буфер, pH 7,5; 0,02 М КСl, концентрация ацетилхолина  $2 \cdot 10^{-3}$  М). Время, необходимое для полного завершения реакции фермента с ингибитором, оценивалось экспериментально.

*Ферментативную активность* определяли по начальным скоростям гидролиза субстрата, которые измеряли или потенциометрическим методом посредством непрерывной регистрации изменения значения pH в ходе реакции в интервале pH 7,55–7,50 (субстрат — ацетилхолин) [20], или флуориметрическим методом (субстрат —  $\alpha$ -нафтилацетат); E определяли как мкМ ацетилхолина/мин · мг белка.

*Концентрацию связывающих (анионных) центров* пропионилхолинэстеразы определяли методом флуоресцентного титрования по тушению флуоресценции иодида N-метилакридиния при постоянной концентрации фермента 0,943 мг/мл; общую концентрацию зонда варьировали в интервале  $8 \cdot 10^{-8}$ – $8 \cdot 10^{-7}$  М. Константу диссоциации  $K_d$  его комплекса с пропионилхолинэстеразой и концентрацию связывающих центров  $[E]_0$  определяли графически по наклону прямой и отсекаемому отрезку в соответствии с уравнением

$$\frac{1}{[M]_{\text{связ}}} = \frac{1}{[E]_0} + \frac{K_d}{[E]_0} \cdot \frac{1}{[M]_{\text{своб}}}, \quad (9)$$

где  $[M]_{\text{связ}}$  и  $[M]_{\text{своб}}$  — концентрации зонда, связанного в комплекс с ферментом, и в растворе соответственно. Получены значения  $[E]_0$   $3,53 \cdot 10^{-7}$  М на мг белка и  $K_d$   $5,0 \cdot 10^{-8}$  М.

*Общую ингибиторную способность* необратимых ингибиторов оценивали по величине бимолекулярной константы скорости реакции фермента с ингибитором

$$k_{II} = \frac{k_{\text{набл}}}{[I]_0} = \frac{1}{t[I]_0} \lg \frac{v_0}{v_t} \quad (10)$$

\* Разброс температуры плавления, по-видимому, обусловлен способностью иодида N-метилакридиния легко отщеплять иодистый метил при нагревании [14]. В зависимости от начальной температуры и скорости нагрева различия в температурах плавления, определяемых с помощью столика Кофлера, могут достигать 25–30° С.

в соответствии с формальной схемой (1) в условиях  $[I]_0 \gg [E]_0$ , где  $[I]_0$  и  $[E]_0$  — начальные концентрации ингибитора и фермента,  $v_0$  — начальная скорость гидролиза субстрата под действием фермента,  $v_t$  — скорость гидролиза субстрата через время  $t$  инкубации фермента с ингибитором; константу скорости псевдопервого порядка  $k_{набл}$  определяли из графика  $\lg(v_0/v_t) = f(t)$  по тангенсу наклона прямой.

Антихолинэстеразную активность,  $K_i$ , и тип ингибирования для иодида N-метилакридиния определяли графическим методом Лайнуивера — Берка.

Константы диссоциации фермент-ингибиторных комплексов,  $K_d$ , и удельные константы скорости первого порядка,  $k_2$ , отражающие фосфорилирующую способность необратимых ингибиторов, были определены модифицированным методом О'Брайна [5]. В качестве субстрата использовали  $\alpha$ -нафтилацетат, скорость ферментативного гидролиза которого регистрировали флуориметрически по накоплению  $\alpha$ -нафтола (возбуждение при 320 нм, максимум испускания при 468 нм, спектральная ширина возбуждающей щели  $\leq 14$  нм)\*. Реакцию фермента с ингибитором в присутствии субстрата проводили в условиях псевдопервого порядка, т. е. при  $[I]_0 \gg [E]_0$  и  $[S]_0 \gg [E]_0$ , где  $[S]_0$  — начальная концентрация субстрата.

Расчет  $K_d = k_{-1}/k_{+1}$  и  $k_2$  проводили по формулам, следующим из схемы (8) с учетом одновременной реакции фермента с субстратом, где  $k_{+1}$  и  $k_{-1}$  — удельные константы скорости образования и распада обратимого фермент-ингибиторного комплекса. В этом случае [5]

$$K_d = \frac{K_m [I]_0}{(K_m + [S]_0)(v_0/v_{i(t=0)} - 1)}; \quad (11)$$

$$k_2 = 2,3 \frac{\Delta \lg v}{\Delta t} \left[ \frac{K_d}{[I]_0 \left(1 - \frac{[S]_0}{K_m + [S]_0}\right)} + 1 \right]. \quad (12)$$

Значение  $K_m$  для  $\alpha$ -нафтилацетата было определено графически методом Лайнуивера — Берка (интервал концентраций субстрата  $1 \cdot 10^{-5}$  —  $2 \cdot 10^{-4}$  М); как в случае бутирилхолинэстеразы, так и в случае пропонилахолинэстеразы  $K_m$   $2,1 \cdot 10^{-5}$  М, что хорошо согласуется с литературными данными [2].

Определение кинетических констант флуориметрическим методом проводили при 25°C в  $1/15$  М фосфатном буфере, pH 7,5; концентрации  $[E]_0$ ,  $[S]_0$  и  $[I]_0$  подбирали таким образом, чтобы кинетические зависимости были наиболее пригодны для графического анализа; в случае тиоэффра (I), например,  $[E]_0$  0,002–0,004 мг/мл,  $[S]_0$  (1,0–5,0)  $\cdot 10^{-5}$  М и  $[I]_0$   $7,0 \cdot 10^{-6}$ – $4,3 \cdot 10^{-5}$  М. Скорости накопления  $\alpha$ -нафтола, пропорциональные концентрации свободного фермента, определяли графически по тангенсу угла наклона касательных к кинетической кривой в точках, соответствующих различным временам инкубации фермента с ингибитором. Время  $t$  инкубации отсчитывалось от момента введения фермента в реакционную смесь, содержащую субстрат и ингибитор, до момента достижения определенной интенсивности флуоресценции на кинетической кривой. Наблюдаемая константа скорости реакции фермента с ингибитором при различных  $[I]_0$  находили из графика  $\lg(v_t) = f(t)$  по тангенсу угла наклона прямой; скорости гидролиза субстрата в нулевой момент времени инкубации  $v_{i(0)}$  определяли экстраполяцией к  $t=0$  (рис. 4). Согласно [4, 5], различие между  $v_{i(0)}$  и

\* В наших условиях при ширине щели  $> 14$  нм наблюдалась значительная нестабильность флуоресценции за счет фотохимического распада  $\alpha$ -нафтилацетата. Результаты изучения фотохимии водных растворов этого субстрата будут опубликованы позднее.



$\phi_0$  имеет место только в результате образования обратимого фермент-ингибиторного комплекса. Значения констант ингибирования изученных тиоэфиров приведены в таблице.

Константы диссоциации  $K_d$  обратимых фермент-ингибиторных комплексов для тиоэфиров методом конкурентного вытеснения флуоресцентного зонда определяли следующим образом: раствор пропнопилхолинэстеразы с известной концентрацией связывающих (активных) центров смешивали с раствором флуоресцентного зонда, затем при непрерывной регистрации флуоресценции в максимуме испускания зонда ( $\lambda$  483 нм) к 3 мл термостатированной смеси добавляли 0,5 мл раствора ингибитора оптимальной концентрации (время смешения  $\sim 2$  с); концентрацию ингибитора подбирали таким образом, чтобы кинетическая кривая нарастания флуоресценции имела платообразный участок, указывающий на реализацию псевдоравновесных условий. Конечные концентрации фермента и подида N-метилакридиция после введения ингибитора составляли  $2,5 \cdot 10^{-7}$  и  $2,25 \cdot 10^{-7}$  М соответственно. Расчет  $K_d$  тиоэфиров проводили по выражению (6).

Все флуоресцентные измерения были проведены на спектрофотометре EPS-3T (Hitachi) с приставкой G-3 при 25° С. В необходимых случаях вводили поправки на фоновую флуоресценцию рабочих растворов; оптические плотности в области возбуждения во всех случаях не превышали 0,1.

Авторы выражают свою признательность С. А. Трифоновой за предоставление тиоэфиров (I)–(IV).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Main A. R. (1964) *Science*, **144**, 992.
2. Бресткин А. П., Лапцкий К. В., Самокин В. А., Смирнов О. И. (1974) *Докл. АН СССР*, **219**, 999–1002.
3. Aldridge W. N., Reiner E. (1969) *Biochem. J.*, **115**, 157.
4. Бресткин А. П., Брик И. Л., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Гурдалнев Х. Х., Кабачник М. И., Карданов Н. А. (1971) *Докл. АН СССР*, **200**, 103–106.
5. Hart G. J., O'Brien R. D. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2940–2945.
6. Mooser G., Schulman H., Sigman D. S. (1972) *Biochemistry*, **11**, 1595–1602.
7. Chan L. M., Himel C. M., Main A. R. (1974) *Biochemistry*, **13**, 86–90.
8. Mooser G., Sigman D. S. (1974) *Biochemistry*, **13**, 2299–2307.
9. Rosenberry T. L., Neumann E. (1977) *Biochemistry*, **16**, 3870–3878.
10. Seitz A. M., Himel Ch. M. (1977) *Anal. Lett.*, **10**, 11–19.
11. Einarsson R., Zeppezauer M. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **59**, 295–304.
12. Бресткин А. П., Брик И. Л., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И., Теплов Н. Е. (1967) *Изв. АН СССР. Спр. хим.*, № 9, 1932–1935.
13. Rosenberry T. L., Bernhard S. A. (1971) *Biochemistry*, **11**, 4308–4321.
14. Albert A. (1966) *The Acridines*, p. 343, London.
15. Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И., Михельсон М. Я., Рожкова Е. К., Фруентов Н. К., Яковлев В. А. (1961) *Вопр. мед. химии*, **7**, 250–258.
16. Годовиков Н. Н., Теплов Н. Е., Трифонова С. А., Кабачник М. И. (1974) *Ж. общ. химии*, **44**, 30.
17. Годовиков Н. Н., Трифонова С. А., Кабачник М. И. (1974) *Ж. общ. химии*, **44**, 1011.
18. Гурьяпова С. И. (1977) *Лаб. дело*, **1**, 55.
19. Berry W. K. (1951) *Biochem. J.*, **49**, 615.
20. Яковлев В. А., Агабекян Р. С. (1966) *Биохимия*, **31**, 258.
21. Augustinsson K. B., Eriksson H. (1979) *Biochem. and Biophys. Acta*, **567**, 161–173.

Поступила в редакцию  
8.I.1979

После доработки  
11.III.1979

**DETERMINATION OF SOME ORGANOPHOSPHORUS INHIBITOR AFFINITIES FOR  
THE ACTIVE SITE OF CHOLINESTERASES BY THE KINETIC AND FLUORESCENT  
PROBE METHODS**

EYREINOV V. I., SEMENOVA V. N., GODOVIKOV N. N.,  
KABACHNIK M. I.

*Institute of Organo Element Compounds, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

A method for determining the affinity of irreversible organophosphorus inhibitors for the active site of cholinesterases was proposed. It is based on competitive displacement by these inhibitors of a highly specific fluorescent probe, N-methylacridinium iodide. As was found with four thioesters of phosphorus acids, the dissociation constants of reversible enzyme-inhibitor complexes determined by the kinetic and fluorescence methods agree fairly well. The kinetic schemes presently used for analyzing the irreversible inhibition of cholinesterases were discussed and the conclusion was reached that the classification of organophosphorus inhibitors as purely irreversible or irreversible with mixed type of activity is only conventional.

---