



УДК 577.153.02:541.127

## ТРОЙНЫЕ КОМПЛЕКСЫ В РЕАКЦИЯХ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗОЙ

*Алебян Г. П.*

*Институт тонкой органической химии им. А. Л. Минцояна  
Академии наук АрмССР, Ереван*

*Бресткин А. П., Сажокин В. А.*

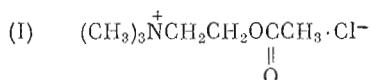
*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
Академии наук СССР, Ленинград*

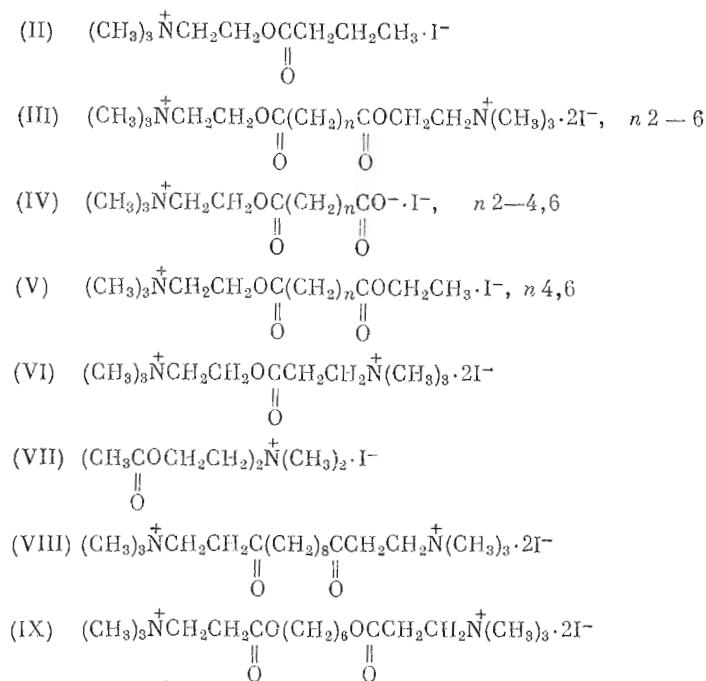
Изучены отклонения от михаэлисовской кинетики для реакций, катализируемых бутирилхолинэстеразой сыворотки крови лошади. Показано, что при гидролизе субстратов, содержащих в своей структуре фрагменты с одним положительным зарядом (ацетилхолин, бутирилхолин, иодид N-метил-7-ацетоксихинолина), наблюдается нелинейность зависимостей Лайнуивера — Берка. Линейная зависимость характерна для гидролиза субстратов, содержащих более одного заряда (ди- и монохолиновые эфиры алифатических дикарбоновых кислот) и для гидролиза незаряженного субстрата —  $\alpha$ -нафтилацетата.

Отклонения от чисто конкурентных отношений наблюдались при ферментативном гидролизе в системах заряженный — незаряженный, заряженный — заряженный субстраты, а также субстрат — обратимый ингибитор. При этом в качестве обратимого ингибитора использовали два бисаммониевых соединения. На основе весьма нестройной специфичности бутирилхолинэстеразы для объяснения наблюдаемых аномалий выдвинута модель, допускающая возможность образования тройных михаэлисовских комплексов типа ESS, ESS<sub>1</sub> или ESI.

Нарушения конкурентных отношений между молекулами субстратов в реакциях, катализируемых холинэстеразами, наблюдались многими исследователями [1—10]. Рассматриваемое явление прослеживается при работе в широких интервалах изменения концентраций субстрата ( $10^2$ — $10^3$  раз), в то время как в узких интервалах изменения этой величины можно фиксировать кажущееся соблюдение конкурентных соотношений. Вследствие этого в литературных данных содержатся противоречия. Например, измерения скорости ферментативной реакции для чистого фермента в широком интервале концентраций субстратов [6] вообще не укладываются в рамки уравнения Михаэлиса — Ментен и в то же время имеется большое количество работ, содержащих значения  $K_m$  и  $V$  для тех же субстратов, определенные в узких, методически удобных интервалах концентраций на неочищенных препаратах фермента.

Целью настоящей работы было исследование конкурентных соотношений для разных субстратов и обратимых ингибиторов в реакциях с бутирилхолинэстеразой сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8). Объектами исследования служили субстраты: ацетилхолин (I), бутирилхолин (II), дихолиновые (III), монохолиновые (IV) и смешанные холиноэтиловые (V) эфиры алифатических дикарбоновых кислот, дииодметилат  $\beta$ -диметиламиноэтилового эфира N,N-диметилаланина (VI), иодметилат диуксуснокислого эфира N-метиламинодиэтанола (VII) и обратимые ингибиторы: дииодметилат 1,14-диметиламино-2,12-тетрадекандиола (VIII) и гексатоллин (IX):





Общая схема исследований состояла в том, что сначала определяли зависимость скорости ферментативного гидролиза субстрата от его концентрации в широком интервале, а затем изучали ингибирующее действие каждого субстрата и некоторых обратимых ингибиторов на гидролиз  $\alpha$ -нафтилацетата (X) и иодида N-метил-7-ацетоксихинолина (XI). Выбор систем для изучения смесей обусловлен тем, что продукты гидролиза —  $\alpha$ -нафтол и иодид N-метил-7-оксихинолина, определяются флуориметрически и, следовательно, скорости гидролиза субстратов (X) и (XI) могут быть измерены независимо от гидролиза второго компонента смеси. Чувствительность флуориметрического метода позволила провести исследование при малых концентрациях ( $\leq 0,1K_m$ ) субстратов (X) и (XI), и поэтому считали возможным пренебречь их влиянием на реакцию фермента со вторым компонентом смеси. Соответственно, определяемые в этих системах параметры ингибирования рассматривались как характеристики насыщения фермента вторым компонентом смеси, не возмущенные присутствием субстратов (X) и (XI).

Характерный пример нарушения кинетики Михаэлиса представлен на рис. 1. Активация фермента при больших концентрациях субстрата характерна для соединений (I), (II) и (XI). Для субстратов (X) и (III) таких отклонений не наблюдалось. Анализ зависимостей  $1/v$  от  $1/[S]$  показал, что для соединений (I), (II) и (XI) в области малых концентраций субстрата может быть выделен линейный участок. Значения  $K_m$  и  $V$  для этих субстратов были определены экстраполяцией этого участка при  $[S] \rightarrow \infty$ .

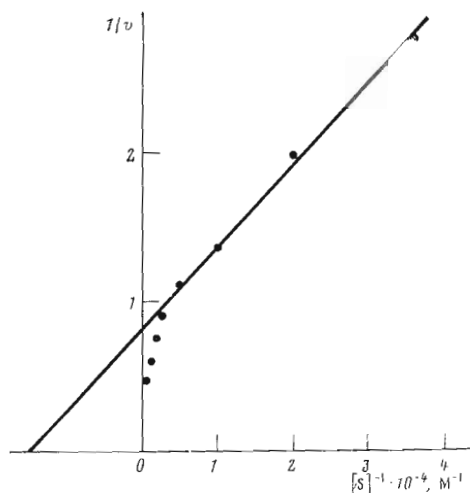


Рис. 1. Зависимость скорости реакции, катализируемой бутгирлхолинэстеразой, от концентрации ацетилхолина в координатах Лайнуивера — Берка

Значения  $K_m$  и  $V$  для других веществ определялись либо из обычных графиков Лайнуивера — Берка, либо в случае соединения (III) косвенным методом [11].

Значения  $K_m$ , полученные при изучении собственного гидролиза субстратов, сопоставлялись с величинами  $K_m$ , полученными из данных по ингибированию ими гидролиза субстратов (X) или (XI) в смесях. Принцип изучения смесей описан в работе [11]. Сущность его состоит в измерении скорости гидролиза флуорогенного субстрата в присутствии конкурирующих субстратов в разных начальных концентрациях.

Если ограничиться малыми превращениями конкурирующего субстрата, то экспериментальные результаты можно описать уравнением (1) [11]:

$$\frac{[S]_0}{K_m} = \frac{\alpha - v_\varphi}{v_\varphi - \beta}, \quad (1)$$

где  $[S]_0$  и  $K_m$  — начальная концентрация и константа Михаэлиса изучаемого субстрата,  $\alpha$  и  $\beta$  — скорости гидролиза флуорогенного субстрата под действием свободного фермента и нековалентного комплекса изучаемого субстрата с ферментом соответственно,  $v_\varphi$  — наблюдаемая скорость гидролиза при данном значении  $[S]_0$ . Для графического анализа более удобен следующий вид уравнения (1):

$$\frac{1}{\alpha - v_\varphi} = \frac{1}{\alpha - \beta} + \frac{K_m}{(\alpha - \beta)[S]_0}. \quad (2)$$

В тех пределах, где будет справедливо  $\beta = \text{const}$ , наблюдается линейная зависимость  $1/(\alpha - v_\varphi)$  от  $1/[S]_0$ . Такая же зависимость должна соблюдаться при  $\beta = 0$ , т. е. при абсолютно конкурентных взаимоотношениях субстратов. Для последнего случая можно пользоваться уравнением (1), преобразованным следующим образом:

$$\frac{1}{v_\varphi} = \frac{1}{\alpha} + \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{[S]_0}{K_m}. \quad (3)$$

Полученное уравнение (3) практически является модификацией уравнения Диксона, и зависимость  $1/v_\varphi$  от  $[S]_0$  должна быть линейной [12]. Очевидно, приведенные соображения приемлемы и для системы фермент — субстрат — обратимый ингибитор.

Рассмотренный способ обработки данных направлен на анализ таких систем, в которых обратимый ингибитор или второй субстрат подавляет скорость реакции изучаемого субстрата не до нуля, как это имеет место при конкурентных отношениях (ур-ние (3)), а только до определенного значения (ур-ние (2)). Именно такой эффект наблюдался ранее [11] для смесей бутирилхолинэстеразы с субстратами (III) и (X) и в настоящей работе для подавляющего большинства систем. Характерные примеры экспериментальных зависимостей представлены на рис. 2—5.

Значения  $K_m$ , определенные таким способом, совпадают со значениями  $K_m$ , определенными при измерении собственного гидролиза субстратов (таблица).

Степень нарушения конкурентности в смысле глубины торможения превращения субстратов (X) и (XI) другими субстратами представлена зависимостями  $v_{(X)}$  или  $v_{(XI)}$  от  $[S]_0/K_m$  (рис. 6, 7). Необходимо отметить, что для соединений (I) и (II) область их концентраций, в которой происходит начальное падение  $v_{(X)}$  и  $v_{(XI)}$  соответствует области, в которой при изучении их собственного гидролиза наблюдается линейный участок графика Лайнуивера — Берка.

Системы, содержащие в качестве конкурирующего субстрата соединение (X), имеют неконкурентный характер. Дихолиновые эфиры в концентрациях  $10K_m$  тормозят гидролиз субстрата (X) на 70% вместо 90%, т. е. остаточная активность фермента составляет 30% вместо 10%. Монохолиновые эфиры дикарбоновых кислот (IV) и соединение (VII) при та-

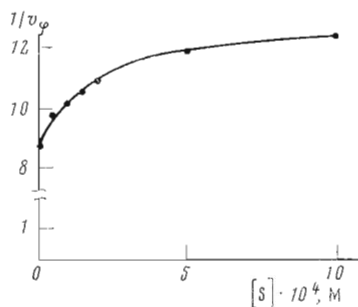


Рис. 2

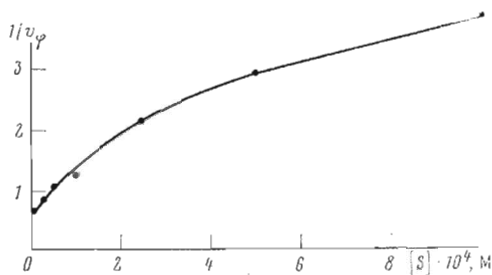


Рис. 3

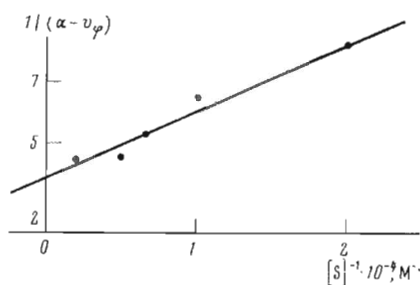


Рис. 4

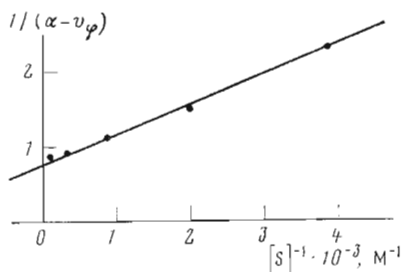


Рис. 5

Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза  $\alpha$ -нафтилацетата, катализируемого бутирилхолинэстеразой, от концентрации ацетилхолина (S) в координатах Диксона

Рис. 3. Зависимость скорости гидролиза иодида N-метил-7-ацетоксихинолина, катализируемого бутирилхолинэстеразой, от концентрации ацетилхолина (S) в координатах Диксона

Рис. 4. Зависимость скорости гидролиза  $\alpha$ -нафтилацетата, катализируемого бутирилхолинэстеразой, от концентрации ацетилхолина (S) в координатах, учитывающих неконкурентные отношения

Рис. 5. Зависимость скорости гидролиза иодида N-метил-7-ацетоксихинолина, катализируемого бутирилхолинэстеразой, от концентрации ацетилхолина (S) в координатах, учитывающих неконкурентные отношения

кой же концентрации вообще практически не тормозят гидролиз субстрата (X), и остаточная активность фермента для этих субстратов равна 100% вместо 10%. Остальные субстраты дают остаточную активность в промежутке от 30 до 100% (рис. 6, таблица). Отклонения от неконкурентности существенно слабее выражены для системы, где конкурирующим субстратом является заряженное положительно соединение (XI). Как показано на рис. 7, все изученные вещества, несущие два заряда в молекуле, в концентрациях до  $10K_m$ , конкурентны. Однако субстраты, несущие один положительный заряд, и в этой системе проявляют значительную неконкурентность — остаточная активность фермента составляет 18–20% вместо 10%. Обратимые ингибиторы (VIII) и (IX) также неконкурентны (см. рис. 6, 7 и таблицу).

Таким образом, отклонения от михаэлисовской кинетики проявляются для субстратов или в их собственном гидролизе, или, более четко, в смесях с другими субстратами. Систематическое изучение отклонений от михаэлисовской кинетики, а также исследование высокоочищенного препарата бутирилхолинэстеразы приводит к следующим основным выводам: 1) кинетические аномалии являются свойством индивидуального фермента; 2) неконкурентные соотношения осуществляются в реакциях гидролиза заряженных субстратов, а также в смесях субстратов.

Для объяснения отклонений от михаэлисовской кинетики в литературе предлагаются различные модели и гипотезы: теория аллостергической регуляции ферментативного действия (Монно, Шанже и Жакоба), индуцированного структурного соответствия, предложенная Кошландом, модель

**Константы Михаэлиса (ингибирования) изученных соединений и величины остаточных активностей бутирилхолинэстеразы при концентрации конкурирующих субстратов  $10K_m$**

Соединение	$K_m \cdot 10^4$ , М (по данным собственного гидролиза)	$K_m \cdot 10^4$ , М (метод конкурирующих реакций)*	Остаточная активность, %	
			Субстрат (X)	Субстрат (XI)
(I)	0,5	40 (X), (XI)	70	19
(II)	0,37	30 (X), (XI)	50	
(VII)	2	120 (XI)	100	19
(V) $n = 4, 6$	~0,1	6-9 (X), (XI)	35 (при $100K_m$ )	19 ( $n = 4$ )
(III), $n = 2-6$	Ниже чувствительности метода	0,33-0,89 (X)	28	10
(IV), $n = 2-4, 6$		9-23	100	10
(VIII)	-	0,04	25	10
(IX)	-	1,2	40	10

\* В скобках указан шифр конкурирующего субстрата.

симметричных многоцентровых взаимодействий Монно, Шанже, Уимена, модель гомотропного кооперативного эффекта и т. д. Все эти модели так или иначе основаны на предположении о конформационных изменениях молекулы регуляторного фермента, которые происходят в результате присоединения эффектора к специфическому месту связывания, что делает молекулу фермента либо более, либо менее активной, чем в его исходной форме.

Эти модели легко объясняют явления субстратной активации или субстратного ингибирования. Однако наблюдаемые отклонения от конкурентности не могут быть объяснены без их дальнейшего усложнения. Имеются в виду количественные различия остаточной активности бутирилхолинэстеразы по отношению к  $\alpha$ -нафтилацетату в присутствии разных исследованных субстратов. Как было отмечено, остаточная активность в присутствии конкурирующего субстрата в концентрации  $10K_m$  варьирует в широком интервале — от 30 до 100%. Стопроцентная остаточная активность говорит о том, что гидролиз субстратов смеси протекает как бы независимо друг от друга. С другой стороны, неясен различный характер влияния высоких концентраций субстратов (I), (II) и т. д. на собственный гидролиз и гидролиз конкурирующего субстрата. Собственный гидролиз, например, соединения (I) при высоких концентрациях ускоряется, а гидролиз конкурирующего субстрата под действием соединения (I) в тех же концентрациях замедляется.

Наблюдаемые явления могут быть понятны без представлений о множественности участков связывания субстратов и о дальнедействующих взаимодействиях таких участков. В основу предлагаемой модели положим результаты изучения гидролиза смесей разных субстратов с  $\alpha$ -нафтилацетатом (рис. 6). По этим данным, гидролиз последнего протекает при глубоком насыщении фермента ( $[S]/K_m \geq 10$ ) в значительно большей степени, чем допускало бы соблюдение конкурентных соотношений. Поскольку оба компонента такой смеси являются субстратами и гидролизуются в ходе эксперимента, по-видимому, следует считать, что полное насыщение активного центра фермента заряженным субстратом не создает абсолютных препятствий для реакции субстрата (X) с каталитической группой того же активного центра. Это приводит к предположению, что в одном активном центре фермента возможно связывание более чем одной молекулы субстрата. Такое допущение основывается на том, что бутирилхолинэстераза не обладает сколько-нибудь строгой специфичностью. Структуры гидролизуемых ферментом субстратов настолько различны, что трудно представить себе одинаковые взаимодействия при образовании нековалентного комплекса. Единственное, что является общим для всех субстратов, — это присутствие сложноэфирной группы.

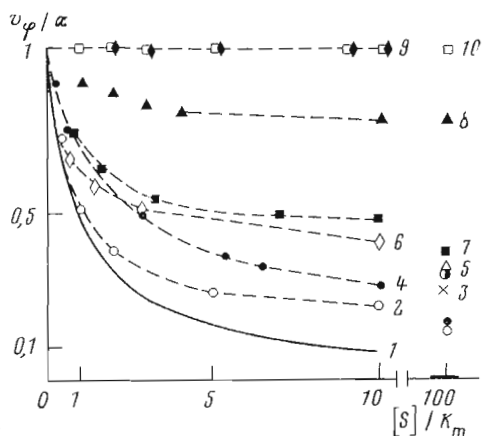


Рис. 6

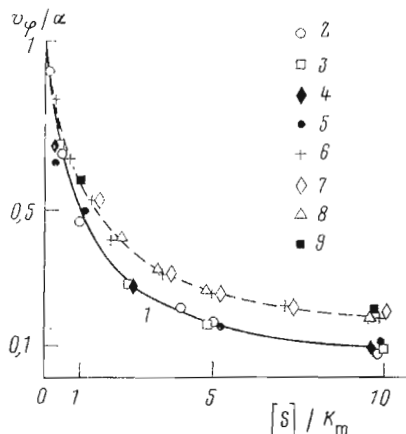


Рис. 7

Рис. 6. Зависимость степени торможения ферментативного гидролиза  $\alpha$ -нафтилацетата в присутствии субстратов ((V,  $n=6$ ) - 3; (III,  $n=2-6$ ), (VI) - 4; (V,  $n=4$ ) - 5; (II) - 7; (I) - 8; (IV,  $n=2-4,6$ ) - 9; (VII) - 10) и обратимых ингибиторов ((VIII) - 2; (IX) - 6). Кривая 1 - теоретическая

Рис. 7. Зависимость степени торможения ферментативного гидролиза иодида N-метил-7-ацетоксихинолина в присутствии субстратов ((III,  $n=2$ ) - 2; (IV,  $n=2-4,6$ ) - 3; (VI) - 4; (V,  $n=4$ ) - 6; (I) - 7; (II) - 8; (VII) - 9) и обратимого ингибитора (VIII) - 5. Кривая 1 - теоретическая

Основные положения модели следующие: 1) в непосредственной близости от каталитического центра могут находиться одновременно более чем одна молекула субстрата; 2) дезацилирование не является лимитирующей стадией ферментативного гидролиза  $-k_2 \ll k_3$ , т. е. каталитическая группа в основном находится в неацилированном состоянии; 3) заряженные субстраты, содержащие четвертичный азот, имеют один преимущественный путь связывания с использованием анионного центра фермента; 4) скорость гидролиза субстрата мало зависит от пути его связывания.

В соответствии с предлагаемой моделью можно объяснить экспериментальные данные по отклонению от михаэлисовской кинетики. Как уже было описано выше, такие отклонения проявляются для заряженных субстратов в виде «субстратной активации», т. е. при высоких концентрациях субстрата измеряемые величины скоростей получаются больше, чем можно было ожидать из определения параметров уравнения Михаэлиса при сравнительно низких концентрациях субстрата. Можно предположить, что при низких концентрациях заряженный субстрат сорбируется на поверхность фермента с некоторым параметром  $K_m$ , и эта сорбция связана с взаимодействием заряда субстрата с анионным центром. При увеличении концентрации субстрата сверх значений, почти полностью насыщающих фермент по пути с использованием заряда, наблюдается второй этап насыщения фермента с иным параметром  $-K_{m_2}$ . Второй этап насыщения, по-видимому, происходит без использования заряда субстрата. Эти два параметра для субстратов (I) и (II) имеют соотношение  $K_{m_2} \approx 100K_m$ . Субстраты, не несущие заряд, лишены возможности связываться с использованием анионного центра. Иными словами, все пути связывания незаряженного субстрата одинаковы ( $K_{m_1} = K_{m_2}$ ) и центры связывания насыщаются одновременно. Наблюдаемая скорость будет суммарной по двум путям связывания. Добавим, что использование терминов «первый» и «второй» путь условно.

Таким же образом можно понять некокурентные соотношения при ферментативном гидролизе смесей субстратов. Прежде всего, при малых концентрациях заряженный субстрат вытесняет любого конкурента из области анионного центра, относительно слабее конкурируя за другие пути связывания. Поэтому четко проявляется некокурентность в смесях

с  $\alpha$ -нафтилацетатом. В смесях с субстратом (XI), который сам должен преимущественно взаимодействовать с анионным центром, неконкурентность выражена существенно слабее. Количественные различия отклонений от полной конкурентности, очевидно, могут зависеть от различных факторов, например от суммарного заряда субстратов, их размеров, жесткости структур и т. д. Для выявления закономерностей в этом смысле нужно систематическое изучение более широкого круга субстратов. Однако и имеющиеся данные позволяют заключить, что суммарный заряд субстрата играет очень важную роль. Так, из исследованных нами субстратов в смесях с  $\alpha$ -нафтилацетатом самое меньшее отклонение от конкурентности дают бисчетвертичные субстраты, сравнительно большее — субстраты с одним четвертичным азотом и суммарным зарядом +1 (соединения (I), (II) и (V) с  $n$  4,6). И абсолютно неконкурентно ведут себя — до концентраций  $10K_m$  — монохолиновые эфиры дикарбоновых кислот (IV), у которых суммарный заряд равен нулю. В эту закономерность не укладывается субстрат (VII), у которого суммарный заряд равен +1; он также не тормозит гидролиз  $\alpha$ -нафтилацетата.

Для смесей с заряженным субстратом (XI) наблюдается иная картина. Здесь имеет значение не суммарный заряд конкурирующего субстрата, а число зарядов в молекуле. Дихолиновые эфиры, соединение (VI) и монохолиновые эфиры, которые имеют в молекуле два заряда, до концентрации  $10K_m$  ведут себя конкурентно, без отклонений. Субстраты (I), (II), (VII) и (V) с  $n$  4,6, несущие один заряд, при таких же условиях проявляют почти одинаковую неконкурентность.

Эффект неконкурентного торможения обратимых ингибиторов, по-видимому, связан с тем, что для заряженных ингибиторов, как и для субстратов, при сорбции на поверхности каталитического центра фермента (с использованием и без использования анионного центра) обратимый ингибитор может создавать стерические или (и) электростатические препятствия для реакции субстрата с ферментом. Баланс этих факторов определит степень неконкурентности.

В рамках предложенной модели можно объяснить и защитное действие субстратов на фермент в присутствии необратимых фосфорорганических ингибиторов. Известно [13—17], что в присутствии субстратов реакция фосфорорганических ингибиторов с холинэстеразами тормозится. Если предположить [13—16], что они вступают в реакцию только со свободным ферментом, т. е. абсолютно конкурентны субстрату, то в их присутствии при любой концентрации бимолекулярная константа ( $k_{II}$ ) соответственно уравнению Михаэлиса — Ментен будет иметь следующий вид:

$$k_{II} = \frac{1}{[I]t} \ln \frac{[E]_0}{[E]_0 - [ES]} = \frac{k_{II_0} K_m}{K_m + [S]} \quad (4)$$

Здесь [I], [E]<sub>0</sub>, [ES], [S] — концентрации ингибитора, фермента, фермент-субстратного комплекса и субстрата;  $k_{II_0}$  — бимолекулярная константа реакции фосфорорганического ингибитора с ферментом в отсутствие субстрата.

Авторы работ [14—17] сравнивали экспериментальные значения  $k_{II}$  в присутствии субстрата (I) и их рассчитанные значения, принимая  $K_m$  равной 1,25 мМ. Оказалось, что при низких концентрациях субстрата (I) экспериментально определенные величины были ниже ожидаемых, рассчитанных соответственно по уравнению (4), т. е. наблюдалась сверхконкурентность, количественно разная для разных фосфорорганических ингибиторов. При высоких же концентрациях субстрата (I) проявлялась значительная неконкурентность.

Такие же эксперименты проводились с незаряженным субстратом — фенилацетатом [15]. В этих экспериментах для разных необратимых ингибиторов такого рода отклонения не наблюдались.

Выводы авторов работ [14, 15, 18] сделаны без учета того факта, что гидролиз самого субстрата (I) не подчиняется уравнению Михаэлиса (наличие двух величин  $K_m$ , сильно отличающихся друг от друга). Если оперировать значением  $K_m$  50 мкМ, определенным нами, то уже при низких

концентрациях соединения (I) проявляется его неконкурентное отношение с фосфорорганическими ингибиторами в реакции с бутирилхолинэстеразой. Полученные же количественно разные отклонения аналогичны явлениям, наблюдаемым при гидролизе смесей субстратов.

Для систем фосфорорганический ингибитор — фенолацетат — бутирилхолинэстераза отклонений не наблюдается согласно предлагаемой модели по той причине, что все пути связывания фенолацетата равноценны. Следовательно, фенолацетат заселяет все сорбционные центры одинаково в соответствии со своим значением  $K_m$  в отличие от ацетилхолина, у которого есть предпочтительный вид сорбции с использованием заряда.

Таким образом, системы фосфорорганический ингибитор — субстрат — бутирилхолинэстераза являются еще одним примером общности неконкурентных соотношений в реакциях, катализируемых этим ферментом. Отметим, что обсуждаемая модель носит гипотетический характер. Она сформулирована на основе весьма нестрогой специфичности бутирилхолинэстеразы и противоречит представлению об обязательной комплементарности активного центра фермента и субстрата. Тем не менее при минимальных, хотя и серьезных, допущениях модель помогает понять суть неконкурентных соотношений в реакциях, катализируемых бутирилхолинэстеразой.

### Экспериментальная часть

Ферментативный гидролиз сложных эфиров измеряли методом  $\Delta$  pH с использованием электрометрического усилителя TR-1501 и записывающего потенциометра ЭПП-09 МЗ. Исследования по смесям конкурирующих реагентов с субстратами (X) и (XI) проводили по описанной ранее методике [11, 19]. Все эксперименты были выполнены при 25°С в 0,002 М натрий-фосфатном буфере.

Бутирилхолинэстераза сыворотки крови лошади — препарат Пермского НИИ вакцин и сывороток с активностью 13,6 МЕ/мг. Субстраты (I) — (V), (X) и (XI) описаны в работе [11], субстраты (VI) и (VII) — в работе [20]. Обратимые ингибиторы (VIII) и (IX) были любезно предоставлены нам проф. М. Я. Михельсоном (ИЭФБ АН СССР). Содержание основного вещества в субстратах не менее 98—99%.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Wilson J. B. J. Biol. Chem., 1954, v. 208, № 1, p. 123—132.
2. Heilbronn E. Acta chem. scand., 1958, v. 12, № 9, p. 1879—1880.
3. Main A. R., Tarkan E., Aull J. L., Soucie W. G. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 2, p. 566—571.
4. Rosenberry T. L., Bernhard S. A. Biochemistry, 1972, v. 11, № 10, p. 4308—4321.
5. Augustinsson K. B., Bartafal T., Mannevik B. Biochem. J., 1974, v. 141, № 4, p. 825—834.
6. Main A. R., Soucie W. G., Buxton J. L., Arine E. Biochem. J., 1974, v. 143, № 4, p. 733—744.
7. Бресткин А. П., Брик И. Л. Биохимия, 1967, т. 32, № 1, с. 3—12.
8. Sastry V. R., Chiou C. Y. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 167, № 2, p. 339—354.
9. Волкова Р. И., Дмитриева Е. Н. Биохимия, 1976, т. 41, № 3, с. 443—450.
10. Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахитов А. А., Аслапов Х. А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Ташкент: ФАН, 1976, с. 92—94.
11. Азелян Г. П., Григорян Н. А., Миджоян О. Л., Самокиш В. А. Биоорганическая химия, 1977, т. 3, № 9, с. 1266—1272.
12. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1966, с. 291.
13. Main A. R., Dauterman W. C. Nature, 1963, v. 198, p. 551—553.
14. Бресткин А. П., Волкова Р. И., Розенгарт Е. В. Докл. АН СССР, 1964, т. 157, № 6, с. 1459—1462.
15. Волкова Р. И. Биохимия, 1968, т. 33, № 2, с. 369—374.
16. Яковлев В. А., Волкова Р. И. Докл. АН СССР, 1959, т. 128, № 4, с. 843—846.
17. Яковлев В. А., Волкова Р. И. Докл. АН СССР, 1962, т. 146, № 1, с. 217—220.
18. Волкова Р. И. Биохимия, 1965, т. 30, № 2, с. 292—301.
19. Бресткин А. П., Лапицкий К. В., Самокиш В. А., Смирнов О. И. Докл. АН СССР, 1974, т. 219, № 4, с. 999—1002.



20. Алебян Г. П. Кинетика гидролиза холинных эфиров алифатических дикарбоновых кислот под действием холинэстеразы. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л.: ИЭФБ АН СССР. 19 с.

Поступила в редакцию:  
29.VII.1981

После доработки  
19.X.1981

## TERNARY COMPLEXES IN BUTYRYLCHOLINESTERASE CATALYZED REACTIONS

ALEBYAN G. P., BRESTKIN A. P., SAMOKISH V. A.

*Institute of Fine Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the Armenian SSR, Yerevan; I. M. Sechenov Institute of Evolutionary  
Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad*

Deviations from the Michaelis kinetics for reactions catalyzed by horse serum butyrylcholinesterase have been studied. Non-linear dependence of  $1/v$  versus  $1/S$  was observed for the hydrolysis of substrates containing a fragment with one positive charge: acetylcholine, butyrylcholine, N-methyl-7-acetoxyquinolinium iodide; a linear dependence is characteristic for hydrolysis of substrates having more than one charge, di- and monocholine esters of aliphatic dicarboxylic acids, as well as for uncharged substrate,  $\alpha$ -naphthylacetate. Deviations from pure competitiveness were observed for enzymic hydrolysis in systems charged-uncharged and charged-charged substrates, or substrate-reversible inhibitor. In these experiments bis-ammonium compounds were used as a reversible inhibitor. Taking into account broad specificity of butyrylcholinesterase, to rationalize the described anomalies, a model was proposed which allows for possibility of formation ESS, ESS<sub>1</sub> or ESI ternary complexes.