

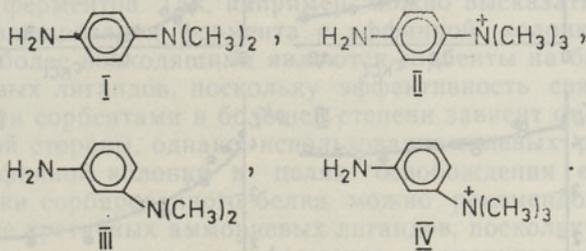
УДК 577.53.4

Реэт ТООМИК, Я. ЯРВ

## ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗ С АФФИННЫМИ СОРБЕНТАМИ НА БАЗЕ ЗАМЕЩЕННЫХ ФЕНИЛЕНДИАМИНОВ

(Представил О. Эйзен)

Эффективность связывания специфических субстратов и ингибиторов с холинэстеразами (КФ 3.1.1.7, 3.1.1.8) зависит от концентрации электролита в реакционной среде [1-4]. Наблюдаемый при этом первичный солевой эффект можно объяснить ион-ионным взаимодействием катионных заместителей лигандов с т. н. анионным центром холинэстераз. Естественно предположить, что аналогичный солевой эффект проявляется также при взаимодействии этих же ферментов с аффинными сорбентами, для синтеза которых в качестве лиганда использованы специфические ингибиторы с аммониевыми заместителями. В настоящей работе рассмотрено действие таких закономерностей проверялось экспериментально для ацетилхолинэстеразы яда кобры и бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади в случае 8 разных аффинных сорбентов, синтезированных на базе АН- и СН-агароз из мета- и парапроизводных фенилендиамина:



При этом эффективность связывания фермента с аффинными сорбентами определяли отдельно в маленьких пробах геля, что допускало расчет констант диссоциации  $K_L$  комплекса фермента с сорбентом и непосредственное сопоставление полученных при этом данных о солевом эффекте с данными о влиянии соли на взаимодействие тех же ферментов с аналогичными обратимыми ингибиторами в растворе. Полученные результаты представляют не только теоретический, но и практический интерес, поскольку градиент ионной силы нередко используется для освобождения фермента с аффинного сорбента, что связано с изменением константы диссоциации комплекса фермент—сорбент в буферном растворе повышенной ионной силы.

Определенные в равновесных условиях константы диссоциации  $K_L$  для комплекса фермента с аффинным сорбентом позволили охарактеризовать влияние электролита (KCl) на равновесие комплексообразования в виде зависимости  $pK_L$  от  $c_{KCl}$ . При этом важно отметить, что опыты проводились в 0,05 М К-фосфатном буфере, что само по себе обеспечивало достаточно высокую ионную силу реакционной среды. Тем не менее добавленная в реакционную среду KCl в значительной степени

влият на величины  $pK_L$ . Полученные для обеих холинэстераз зависимости  $pK_L$  от  $c_{KCl}$  приведены на рис. 1 и 2. На основе этих экспериментальных данных можно сделать следующие выводы.

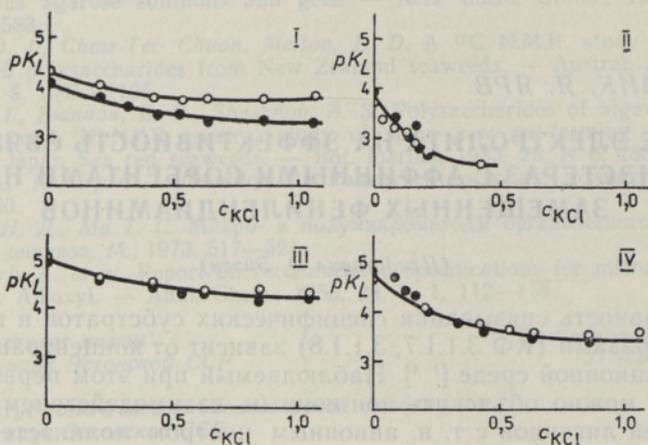


Рис. 1. Влияние концентрации электролита (KCl) на константы диссоциации комплекса ацетилхолинэстеразы с аффинными сорбентами, синтезированными на базе СН-агарозы (○) и АН-агарозы (●). Номера зависимостей соответствуют структурам лигандов I—IV (здесь и на рис. 2).

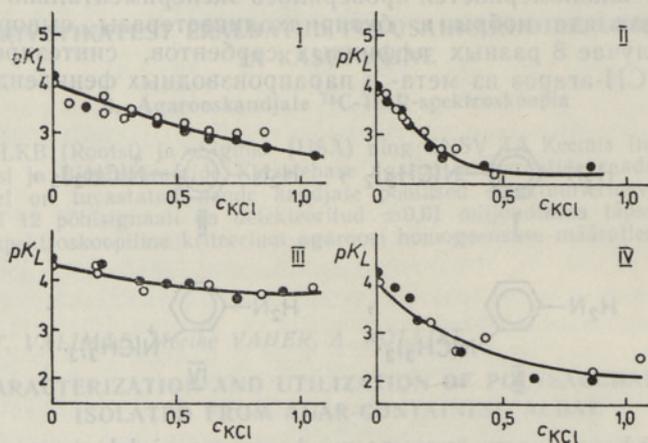


Рис. 2. Влияние концентрации электролита (KCl) на константы диссоциации комплекса бутирилхолинэстеразы с аффинными сорбентами, синтезированными на базе СН-агарозы (○) и АН-агарозы (●).

Во-первых, форма зависимости  $pK_L$  от  $c_{KCl}$  практически идентична для сорбентов, синтезированных на базе АН- и СН-агароз.

Во-вторых, эффективность связывания ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы с теми же сорбентами характеризуется зависимостями одинаковой формы, хотя количественное сопоставление этих кривых затруднено из-за сложной ионной композиции реакционной среды, что не допускает определения ионной силы раствора.

В-третьих, форма зависимости  $pK_L$  от  $c_{KCl}$  для сорбентов с четвертичным и третичным атомами азота четко различается: в случае сорбента с четвертичным атомом азота наблюдается резкое падение эффективности связывания фермента с сорбентом при увеличении  $c_{KCl}$  до 0,3 М, тогда как в присутствии более высоких концентраций соли в зависимости

$pK_L$  от  $c_{KCl}$  образуется «плато». Такая же форма зависимости  $pK_L$  от  $c_{KCl}$  наблюдалась при взаимодействии катионных лигандов с холинэстеразами [5].

В настоящей работе в качестве модельного соединения для лиганда аффинного сорбента использовали 4-ациламино-N,N,N-триметилфенил-аммонийиодид, который является обратимым ингибитором холинэстераз. Из рис. 3 видно, что зависимость  $pK_i$  от  $c_{KCl}$  для этого вещества хорошо моделирует солевой эффект, обнаруженный в случае аффинных сорбентов. При этом изменение  $pK_i$  при переходе от 0,05 М фосфатного буфера к реакционной среде с добавкой концентрированного раствора KCl хорошо соответствует аналогичному изменению в величине  $pK_L$ . Иными словами, максимальная величина солевого эффекта одинакова для аммониевого лиганда в растворе и в составе сорбента.

Можно отметить, что качественно разный характер зависимости  $pK_L$  от  $c_{KCl}$  проявляется в случае диметиламмониевых лигандов, хотя в условиях эксперимента (рН 7,50) эти ингибиторы тоже заряжены положительно. Как видно из рис. 1 и 2, полученные для этих сорбентов зависимости имеют плоскую форму и в относительно широком интервале концентраций соли аппроксимируются в координатах  $pK_L$  и  $c_{KCl}$  прямой, соответствующей эффекту «высаливания». Важно отметить, что описанный в случае четвертичных аммониевых соединений первичный солевой эффект не обнаруживается в классической форме также при взаимодействии 4-N,N-диметиламинофенилацетанилида с ферментами в растворе. Из рис. 4 видно, что зависимость  $pK_i$  от  $c_{KCl}$  существенно отличается от аналогичной зависимости для его четвертичного аналога.

Разный характер влияния соли на эффективность взаимодействия холинэстераз с аффинными сорбентами, синтезированными на базе четвертичных и третичных аммониевых лигандов, представляет определенный практический интерес с точки зрения методики хроматографической очистки ферментов. Так, например, можно высказать предположение, что для элюирования фермента с аффинной колонки градиентом ионной силы более подходящими являются сорбенты на базе четвертичных аммониевых лигандов, поскольку эффективность связывания фермента с такими сорбентами в большей степени зависит от концентрации соли. С другой стороны, однако, использование солевых растворов для промывки аффинной колонки в целях освобождения ее от остатков неспецифически сорбированного белка можно рекомендовать для сорбентов на базе третичных аммониевых лигандов, поскольку в таком случае эффективность связывания фермента незначительно меняется с ростом ионной силы раствора.

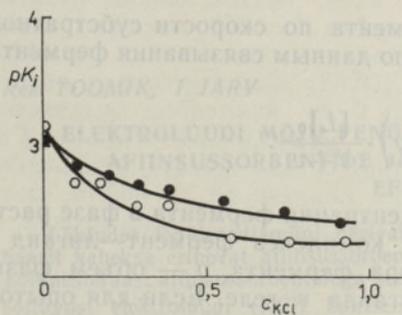


Рис. 3. Зависимость ингибиторных свойств 4-ациламино-N,N,N-триметилфенил-аммонийиодида от концентрации электролита (KCl) для ацетилхолинэстеразы (○) и бутирилхолинэстеразы (●).

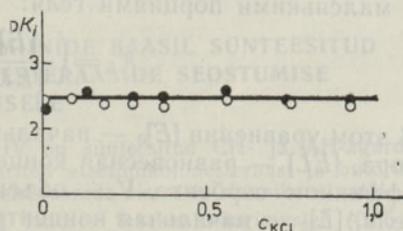


Рис. 4. Зависимость ингибиторных свойств 4-N,N-диметиламинофенилацетанилида от концентрации электролита (KCl) для ацетилхолинэстеразы (○) и бутирилхолинэстеразы (●).

## Экспериментальная часть

В качестве источника ацетилхолинэстеразы использовали яд среднеазиатской кобры (*Наја паја охiana*). Препарат VI класса бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади был получен из Московского НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. Концентрацию фермента в обоих препаратах определяли по скорости гидролиза ацетилтиохолина в оптимальных условиях реакции [6].

Синтез аффинных лигандов 3-амино-N,N-диметиламинобензена (III), хлористого 3-амино-N,N,N-триметилфениламмония (IV), хлористого 4-амино-N,N,N-триметилфениламмония (II) описан в [7]. 4-Амино-N,N-диметиламинобензен (I) использовали в виде сульфата (Рсахим).

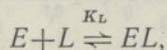
Аффинные сорбенты синтезировали исходя из гранулированной агарозы, выпускаемой Опытным заводом органического синтеза и биопрепаратов Института химии АН ЭССР. Присоединение производных фенилендиамин (I—IV) к СН-агарозе 4В (количество активных групп 15 мкмоль/мл) проводили с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид при рН 4,5 на основе методики [8].

Для получения аффинного сорбента на базе АН-агарозы 4В (количество активных групп 18 мкмоль/мл) сначала проводили сукцинилирование носителя [9]. Присоединение производных фенилендиамин к этому носителю осуществляли карбодимидным методом, как описано выше в случае СН-агарозы.

Для определения концентрации связанного с гелем лиганда использовали спектрофотометрический метод [10]. УФ-спектры сорбентов снимали на спектрофотометре «Perkin Elmer 420», используя суспензию геля в этиленгликоле (1 : 10 по объему).

Связывание холинэстераз с аффинными сорбентами в присутствии соли (КСI) и без нее определяли по уменьшению активности фермента в пробах после добавления порций геля [7]. Активность холинэстераз определяли спектрофотометрическим методом [6], используя в качестве субстрата ацетилтиохолиниодид (Рсахим). Наличие соли не оказывало заметного влияния непосредственно на скорость ферментативного гидролиза ацетилтиохолиниодида, что связано с разбавлением реакционной смеси в 300 раз, а также с использованием 0,15 М К-фосфатного буфера при определении активности фермента.

Данные равновесного связывания ферментов с аффинными сорбентами анализировали исходя из равновесной схемы связывания



определяя количество несвязанного фермента по скорости субстратной реакции. Расчет констант  $K_L$  проводили по данным связывания фермента с маленькими порциями геля:

$$K_L = \left( \frac{[E]_0}{[EL]} \cdot V - v \right) \cdot \frac{[L]_0}{V + v}.$$

В этом уравнении  $[E]_0$  — начальная концентрация фермента в фазе раствора,  $[EL]$  — равновесная концентрация комплекса фермент—лиганд в аффинном сорбенте,  $V$  — объем раствора фермента,  $v$  — объем фазы геля,  $[L]_0$  — начальная концентрация лиганда в геле. Если для опытов выбраны оптимальные соотношения концентраций фермента и сорбента, точность такой методики анализа составляет 15—20% [7].

Константы  $K_i$  для обратимых ингибиторов определяли в бимолекулярных условиях субстратной реакции, где

$$v = k_{II}[S][E] = k_I[S].$$

В присутствии обратимого ингибитора наблюдаемая псевдомолекулярная константа скорости гидролиза зависит от концентрации ингибитора:

$$k_I^{\text{набл}} = \frac{k_I^0}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Константы  $K_i$  рассчитывали из зависимости  $k_I^0/k_I^{\text{набл}}$  от  $[I]$  методом линейных наименьших квадратов. Опыты проводили на спектрофотометре «Perkin Elmer 420» (0,05 М К-фосфатный буфер, рН 7,50, 25 °С), используя в качестве субстрата ацетилтихолиниодид для обоих типов холинэстераз.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Myers, D. K. Effect of salt on the hydrolysis of acetylcholine by cholinesterase. — Arch. Biochem. and Biophys., 1952, 37, N 2, 469—487.
2. Бресткин А. П., Шагаева Г. А. Влияние хлоридов калия и кальция на антихолинэстеразную активность эфиров дифенилфосфиновой и дифенилтиофосфиновой кислот. — Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 6, 1337—1341.
3. Бресткин А. П., Шагаева Г. А. О влиянии хлоридов щелочных и щелочноземельных металлов на скорость ингибирования холинэстераз фосфорорганическими ингибиторами. — Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 7, 1538—1544.
4. Myers, D. K. Effect of electrolytes on cholinesterase inhibition. — Arch. Biochem., 1950, 27, N 2, 341—347.
5. Игумнова Н. Д., Аавиксаар А. А., Богатков С. В. Влияние неорганических солей на взаимодействие бутирилхолинэстеразы с N-метилкарбамоилхолином. — Био-орган. хим., 1978, 4, № 5, 961—971.
6. Ellmann, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr., Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. — Biochem. Pharmacol., 1961, 7, 88—95.
7. Тоомик Р., Эллер М., Ярв Я. Взаимодействие холинэстераз с аффинными сорбентами на базе производных фенилендиаминов. — Изв. АН ЭССР. Хим., 1988, 37, № 1, 30—36.
8. Practical Guide for Use in Affinity Chromatography and Related Techniques. Réactifs IFB-Société Chimique Pointet-Girard, 1983, 134, 126.
9. Cuatrecasas, P. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. — J. Biol. Chem., 1970, 245, N 12, 3059—3065.
10. Туркова Я. Аффинная хроматография. М., 1980, 62—103.

Тартуский государственный  
университет

Поступила в редакцию  
1/XII 1987

Reet TOOMIK, J. JÄRV

#### ELEKTROLÜÜDI MÕJU FENÜLEENDIAMIINIDE BAASIL SÜNTEESITUD AFIINSUSSORBENTIDE JA KOLIINESTERAASIDE SEOSTUMISE EFEKTIIVSUSELE

Lähtudes fenüleendiamiini derivaatidest I—IV on sünteesitud CH- ja AH-agaroosi baasil kaheksa erinevat afiinsussorbenti ning uuritud atsetüülkoliinesteraasi ja butüüülkoliinesteraasi afiinsussorbentidega seostumise reaktsioonide dissotsiatsioonikonstantide  $K_L$  sõltuvust elektrolüüdi (KCl) kontsentratsioonist lahuses tasakaalutingimustel (0,05 М К-фосfaatpuhver, рН 7,50, 25 °С). Tulemus on võrreldud elektrolüüdi kontsentratsiooni mõjuga vastavate atsuülaniilidide inhibeerimiskonstantidele  $K_i$ , mis määrati atsetüülkoliini hüdrolyüsireaktsioonil ning näidatud, et dissotsiatsioonikonstantide ja elektrolüüdi kontsentratsiooni vahelist sõltuvust ei mõjuta sorbendi loomus (CH- või AH-agaros) ega atsetüülkoliinesteraasi asendamine butüüülkoliinesteraasiga.  $K_L$ -i sõltuvus soola kontsentratsioonist nihästi lahuses kui ka afiinsussorbendi koostises on märgatavalt erinev tertsiarsete ja kvaternaarsele ligandide puhul.

