

УДК 541(127+64):547.241

## КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПИРИДИНИЙАЛЬДОКСИМАМИ, СОИММОБИЛИЗОВАННЫМИ С ФЕРМЕНТОМ НА ГИДРОФИЛЬНОМ СОПОЛИМЕРЕ

© 1993 г. Ю. А. Осинкин, А. К. Андрианов, Н. А. Платэ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
119899 Москва, Ленинские горы

Поступила в редакцию 26.10.92 г.

Предложена кинетическая схема процесса дефосфорилирования ацетилхолинэстеразы, соиммобилизованной с пиридинийальдоксимами на линейных и сшитых гидрофильных сополимерах. На основании кинетических параметров реакции показано, что повышение реакционной способности соиммобилизованной системы в сравнении с нативными формами обусловлено формированием на стадии синтеза промежуточных комплексов фермент–реактиватор.

Широкое практическое использование фосфороганических соединений (ФОС) и отсутствие надежных методов их детоксикации служит причиной повышенного интереса к полимерным нуклеофильным реагентам, чувствительным к микроличествам органоfosфатов [1, 2]. Особое внимание в связи с возможностью использования в медицинских целях уделяется реагентам, функционирующем в мягких условиях (водные растворы, нейтральные pH) и совмещающим высокую емкость со специфичностью [3]. Ранее сообщалось о синтезе гидрофильного сополимера на основе ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и оксимсодержащего реактиватора, обладающего высокой эффективностью в реакциях детоксикации ФОС [4], однако механизм и кинетические закономерности функционирования такой системы остались недостаточно изучены. Цель настоящей работы – изучение кинетических особенностей реактивации фосфорилированной АХЭ в бинарных, соиммобилизованных на полиакриламидных сополимерах системах фермент–оксимсодержащий реактиватор.

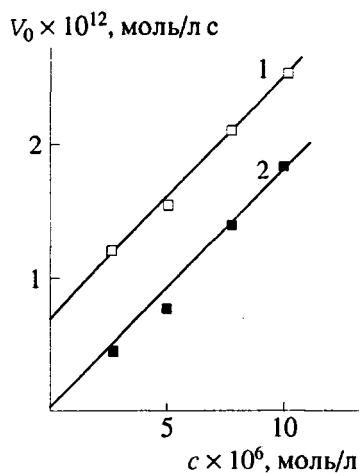
### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали препараты ацетилхолинэстераз (3.1.1.7) эритроцитов крови лошади удельной активности А-2.5 АЕ/мг (АХЭ-1) и электрического угря, А-1355 АЕ/мг (АХЭ-2). Синтез бинарных соиммобилизованных систем осуществляли в водной среде реакцией радикальной сополимеризации акрилоильного производного АХЭ [5], 4-альдоксим-N-[4'-(3-акрилоиламинопропил)-4',4'-диметиламмонийбутил] пиридинийдибромида (ОАП), акриламида и, при

необходимости, бифункционального сшивающего агента N,N'-метилен-бис-акриламида, инициированной окислительно-восстановительной парой персульфат аммония–пиросульфит натрия. В ряде случаев синтез линейных сополимеров проводили модификацией ацетилхолинэстеразой активированных изоксазолиевыми солями оксимсодержащих сополимеров [6]. Сополимеры характеризовали реакциями с ацетилтиохолином [7] и с *n*-нитрофенилацетатом [8]. Контроль за кинетикой гидролиза O,O'-диэтил-O-*n*-нитрофенилфосфата (параоксона) осуществляли с помощью спектрофотометра "Specol-11", регистрируя изменения оптической плотности при 400 нм (поглощение нитрофенолят аниона). Скорость реакции реактивации фосфорилированной АХЭ вычисляли по начальным участкам кинетических кривых, вычитая из общей скорости накопления продукта реакции скорость гидролиза параоксона оксимсодержащим сополимером. Соотношение общего объема реакционной системы при проведении экспериментов в гетерогенных системах и объема набухшего гидрогеля составляло 30 : 1.

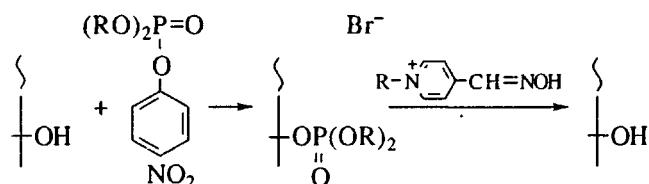
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно [9], что АХЭ избирательно и необратимо реагирует с ФОС; реакция заключается в блокировании гидроксильной группы серина эстеразного центра остатком фосфороганической кислоты. Восстановление первоначальной катализитической активности фермента (реактивация) возможно только под действием высоконуклео-



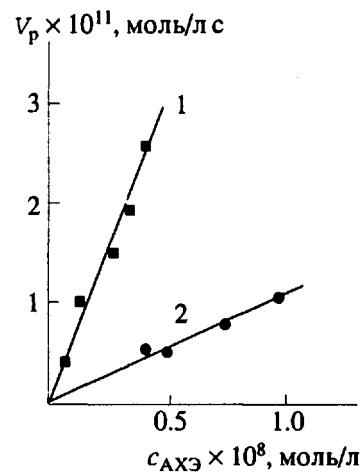
**Рис. 1.** Зависимость скорости гидролиза параоксона линейным сополимером с иммобилизованными АХЭ-2 и ОАП (1) и оксимсодержащим сополимером (2) от концентрации органоfosфата.  $c_{\text{АХЭ}} = 1 \times 10^{-10}$  моль/л;  $c_{\text{ОАП}} = 2 \times 10^{-5}$  моль/л;  $pH = 8.0$ ;  $20^\circ\text{C}$ .

фильтральных реагентов, например, таких как активированные пиридинийальдохимы [9]



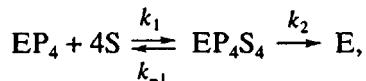
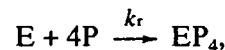
Ранее было показано, что механизм реактивации нативной ингибированной АХЭ проходит через стадию образования промежуточного комплекса Михаэлиса с последующим его разложением на фосфорилированный оксим и катализически активный фермент [9]. Можно было полагать, что при иммобилизации компонентов на гидрофильтральном сополимере механизм реакции не претерпевает существенных изменений и кинетика процесса описывается схемой Михаэлиса–Ментен.

На рис. 1 представлена зависимость скорости реакции гидролиза параоксона линейным сополимером с иммобилизованными ОАП и АХЭ. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что в условиях реакции псевдопервого порядка по параоксону эффективность гидролиза возрастает при введении фермента в сравнении с оксимсодержащим сополимером. Аналогичные зависимости наблюдаются и для гидрогелевых систем. Учитывая, что скорость спонтанной реактивации АХЭ в условиях эксперимента пренебрежимо мала, можно сделать вывод, что повышение скорости гидролиза параоксона обусловлено вкладом процесса дефосфорилирования ингибированного фермента. Исходя из представленных результа-

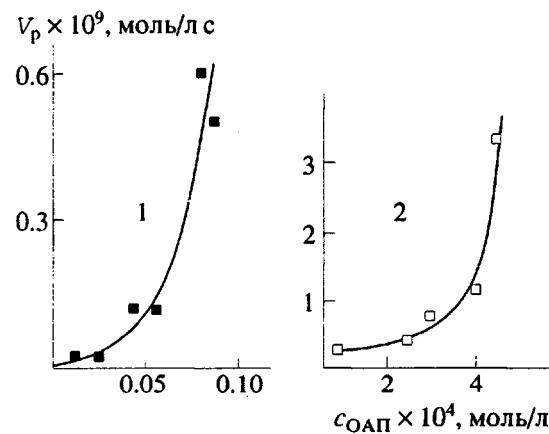


**Рис. 2.** Зависимость скорости реактивации в системе ацетилхолинэстераза–пиридинийальдохим, иммобилизованной на линейном сополимере (1) и в полимерном гидрогеле (2) от концентрации фермента.  $pH = 8.0$ ;  $20^\circ\text{C}$ . 1 – АХЭ-2,  $c_{\text{ОАП}} = 2 \times 10^{-5}$  моль/л; 2 – АХЭ-1,  $c_{\text{ОАП}} = 2 \times 10^{-4}$  моль/л.

тов, предполагающих независимость скорости реактивации от концентрации фосфорорганического ингибитора, а также учитывая первый порядок реакции по концентрации фермента (рис. 2), можно предложить следующую схему процесса:



где  $E$  – АХЭ (аллостерический фермент: 4 активных центра на 1 молекулу),  $P$  – органоfosфат,



**Рис. 3.** Зависимость скорости реактивации в соиммобилизованной системе от концентрации оксимных групп: 1 – линейный сополимер,  $c_{\text{АХЭ-2}} = 2.4 \times 10^{-8}$  моль/л, 2 – гидрогель,  $c_{\text{АХЭ-1}} = 1.3 \times 10^{-7}$  моль/л,  $pH = 8.0$ ;  $20^\circ\text{C}$ .

Таблица 1. Кинетические параметры реакции дефосфорилирования ацетилхолинэстераз пиридинийальдоксимами

Фермент	Концентрация, моль/л	$V_{max}$ , мкмоль/л с				$K_m$ , моль <sup>4</sup> /л <sup>4</sup>			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
AХЭ-1	$1.3 \times 10^{-7}$	$2.1 \times 10^{-5}$	$1.3 \times 10^{-2}$	$8.3 \times 10^{-5}$	$8.4 \times 10^{-2}$	$2.3 \times 10^{-10}$	$3.0 \times 10^{-10}$	$5.7 \times 10^{-11}$	$1.0 \times 10^{-12}$
AХЭ-2	$2.4 \times 10^{-8}$	$4.3 \times 10^{-5}$	-	$1.7 \times 10^{-4}$	-	$4.1 \times 10^{-17}$	-	$8.5 \times 10^{-22}$	-

Примечание. I – нативные формы АХЭ–ТМБ; II – фермент, иммобилизованный в гидрогеле–ТМБ; III, IV – соиммобилизованные АХЭ и ОАП: III – линейный сополимер, IV – гидрогель.

S – пиридинийальдоксим, EP<sub>4</sub>S<sub>4</sub> – катализитический комплекс.

Кинетический анализ схемы в условиях избытка оксиминых групп по отношению к активным центрам фермента приводит к выражению для скорости реактивации фосфорилированной АХЭ

$$V = \frac{V_{max} S_0^4}{K_m + S_0^4}.$$

Здесь  $V_{max}$  и  $K_m$  соответственно теоретическая максимальная скорость реакции и константа Михаэлиса.

Действительно, зависимость скорости дефосфорилирования АХЭ от концентрации субстрата (оксими) носит параболический характер, причем эта тенденция наблюдается как для линейных сополимеров (рис. 3, кривая 1), так и для гидрогелей (рис. 3, кривая 2). Обработка представленных результатов в координатах уравнения Лайнуиева

ра–Берка (рис. 4) позволяет определить кинетические константы  $V_{max}$  и  $K_m$ , полностью описывающие поведение системы в реакции дефосфорилирования ингибиированной АХЭ. В табл. 1 приведены значения этих констант для нативных форм, иммобилизованных на линейном водорастворимом сополимере и в матрице полиакриламидного гидрогеля.

Наблюдаемое снижение  $K_m$  при переходе от нативных к иммобилизованным формам в предположении заведомых диффузионных затруднений для молекул субстрата (оксими) может быть обусловлено формированием еще на стадии синтеза устойчивых комплексов нековалентной природы между активными центрами фермента и оксимодержащими группами за счет электростатических, гидрофобных или других взаимодействий. Фиксация их полимерной матрицей существенно не влияет на функциональные свойства АХЭ в реакциях с ацетилтиохолином и параоксоном, при этом значительно увеличивая эффективность процесса реактивации. Это доказывается возрастанием параметров  $V_{max}$  для соиммобилизованных компонентов. Дополнительным фактором, влияющим на скорость дефосфорилирования ингибиированного фермента, является стабилизация его конформационного состояния при ковалентной иммобилизации на полимерной матрице, замедляющая процессы необратимой инактивации. Действительно, как следует из сравнения результатов, представленных для нативных форм и системы, иммобилизованной в геле АХЭ–низкомолекулярный реагент (1,3-пропилен-(бис-4-альдоксимпиридиний)дибромид (ТМБ)), при неизменной величине  $K_m$  наблюдается снижение теоретической максимальной скорости при реакции компонентов в растворе, вызванное, по-видимому, неконтролируемым уменьшением истинной концентрации активных центров АХЭ в ходе эксперимента. Более высокие значения  $V_{max}$  и низкие значения  $K_m$ , наблюдавшиеся для сшитого сополимера по сравнению с линейным, могут быть связаны с гидрофобизацией зоны реакции при переходе к структуре полимерного гидроге-

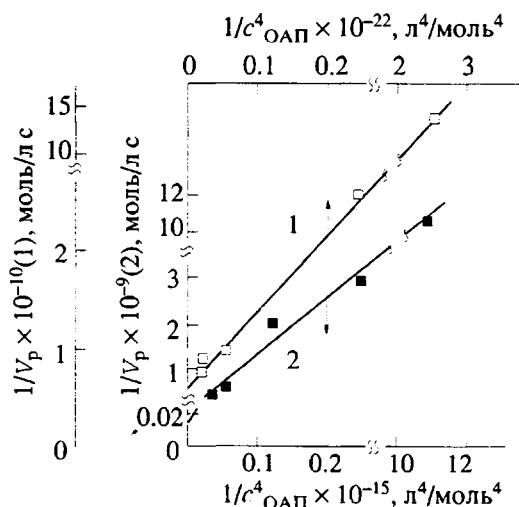


Рис. 4. Зависимость скорости реактивации от концентрации оксиминых групп в координатах уравнения Лайнуиева–Берка. 1 – линейный сополимер,  $c_{AХЭ,2} = 2.4 \times 10^{-8}$  моль/л; 2 – гидрогель,  $c_{AХЭ,1} = 1.3 \times 10^{-7}$  моль/л.  $pH = 8.0$ ;  $20^\circ C$ .

ля, что способствует увеличению скорости внутримолекулярной реакции [10].

Таким образом, процесс реактивации ингибитированной АХЭ, включающий стадию образования промежуточного комплекса, может быть значительно ускорен при иммобилизации компонентов бимолекулярной реакции на полимерных носителях.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шевченко М.А., Таран П.Н., Гончарук В.В. Очистка природных и сточных вод от пестицидов. Л.: Наука, 1989.
2. Moss R.A., Bolikal D., Durst H.D., Hovanek J.W. // Tetr. Lett. 1988. V. 29. No. 20. P. 2433.
3. Андрианов А.К., Осинкин Ю.А., Игонин В.Е., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. А. 1991. Т. 33. № 5. С. 1093.
4. Андрианов А.К., Осинкин Ю.А., Игонин В.Е., Платэ Н.А. // Тез. докл. IX Всесоюз. научн. симп. "Синтетические полимеры медицинского назначения". Звенигород, 1991. С. 135.
5. Андрианов А.К., Чупов В.В., Валуев Л.И., Платэ Н.А. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 318. № 5. С. 1250.
6. Иммобилизованные ферменты / Под ред. Березина И.В., Антонова В.К., Мартинека К. М.: Изд-во МГУ, 1976. Т. 1. С. 172.
7. Ellman G.L. // Biochem. Pharmacol. 1961. V. 7. No. 2. P. 88.
8. Андрианов А.К., Осинкин Ю.А., Чупов В.В., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. Б. 1991. Т. 33. № 4. С. 270.
9. Frontiers of Biology / Ed. by Aldridge W.N., Reiner E. Amsterdam; London, 1972. V. 26.
10. Hodge P., Sherrington D.C. // Polymer Supported Reactions in Organic Synthesis. N. Y.: Wiley, 1980.

### Kinetic Regularities Controlling Dephosphorylation of Acetylcholinesterase by Pyridinium Aldoximes Coimmobilized with the Enzyme on a Hydrophilic Copolymer

Yu. A. Osinkin, A. K. Andrianov, and N. A. Plate

Lomonosov State University, Lenin Hills, Moscow, 119899 Russia

**Abstract** – A kinetic scheme describing dephosphorylation of acetylcholinesterase coimmobilized with pyridinium aldoximes on a hydrophilic copolymer is suggested. Kinetic study of the reaction suggests that enhanced reactivity of the coimmobilized system, compared to the free compounds, is associated with the formation of intermediary enzyme-reactivator complexes.