Введение Ацетилхолинэстераза (AChE) КФ 3.1.1.7. (ацетилхолин – ацетилгидролаза) - фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз ацетилхолина, а также других эфиров холина, обладает гидролазной функцией. Ферментативная реакция, катализируемая ацетилхолинэстеразой, заключается в гидролизе нейромедиатора ацетилхолина: Ацетилхолин – AChE → Холин + Уксусная кислота. Первичная структура AChE включает 543 остатка и практически не имеет отличий для белков из тканей разных органов одного организма. Активный центр AChE включает функциональный His 447, Ser 203, Glu 334 и консервативен для всех организмов. Физиологическая роль AChE состоит в ограничении действия нейромедиатора – ацетилхолина, секретируемого из нервного окончания в синаптическую щель, составленную постсинаптической и пресинаптической мембраной. В нервно-мышечном синапсе в норме ацетилхолин действует на постсинаптическую мембрану короткое время (1–2 мс), и сразу же начинает разрушаться под действием ацетилхолинэстеразы.

Ацетилхолинэстераза присутствует в центральной нервной системе (преимущественно в области постсинаптических мембран), а также в эритроцитах, электрических органах рыб и в змеином яде. В случае полной инактивации AChE на постсинаптической мембране происходит чрезмерное накопление в нервной клетке ацетилхолина, что приводит к блокированию передачи нервных импульсов. Исходя из этого ясно, что вещества, способные угнетать активность AChE, обладают высокой токсичностью и крайне вредны. Однако, известны и нетоксичные или малотоксичные ингибиторы AChE, применяющиеся в медицине при болезни Паркинсона и ряде других заболеваний, сопровождающихся нарушениями нервно-мышечной проводимости. Ферментативная активность AChE традиционно определяется методом Элмана [1], согласно которому измеряется восстановление ацетилтиохолина до холина с отщеплением ацетата, произошедшее за время 30 минут, по специфическому окрашиванию реагентом DTNB (5,5'-дителиобис-(2-нитробензойной кислоты) на ацетат. Активность AChE по Элману определяется в клинических лабораториях при диагностировании ряда заболеваний и как маркерная реакция на присутствие фосфоорганических ингибиторов фермента - AChE в промышленных отходах, сточных водах [2,3]). Исходя из ключевой роли AChE в механизме нервной проводимости, становится понятной актуальность исследований не только ее функциональной активности, но и кинетических параметров реакции, в частности, кинетики ингибирования AChE. Задачей данной статьи было определить границы выполнимости условий квазистационарности реакции Элмана для мышцы *m. extensor digitorum longus* (EDL) и головного мозга крыс линии Вистар с целью проверки применимости данной реакции для определения равновесных кинетических параметров, таких как начальная скорость реакции и константа ингибирования AChE. Материалы и методы. Использовали ингибиторы бутирилхолинэстеразы (BuChE) iso-OMPA

(Tetra(monoisopropyl)pyrophosphortetramide) [4] и ацетилхолинэстеразы (AChE) прозерин (neostigmin) фирмы Sigma. Эстеразы из головного мозга и мышцы EDL крыс получали экстрагируя в гомогенаторе Поттера предварительно замороженный в жидком азоте целевой объект, добавляя 3-х кратный объем буфера А: 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0,5% Tween 20, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA. После добавления 0,02% Полимина Р гомогенаты инкубировали в течение 15 минут на льду, затем центрифугировали 10 000 об/мин 20 минут для удаления клеточных обломков и ДНК. Реакционная смесь для определения эстеразной активности содержала 1 mM ацетилтиохолина, 1,2 mM DTNB, 5-30 мкл клеточного экстракта (1 мг/мл белка в кювете), 0,1 M К-фосфатный буфер pH 8,0; $t = 36^{\circ}\text{C}$. Реакцию, катализируемую бутирилхолинэстеразой (BuChE), ингибировали добавлением специфического ингибитора $2 \cdot 10^{-5}\text{M}$ iso-OMPA. Все исходные растворы готовили непосредственно перед опытом, все используемые реагенты изготовлены фирмой Sigma. Реакцию запускали добавлением субстрата ацетилтиохолина после 5 минутного инкубирования экстракта с ингибиторами в реакционной смеси в термостатируемой кювете при 36°C . Кинетику ферментативной реакции восстановления ацетилтиохолина AChE исследовали дифференциальным методом по измерению оптической плотности при 412 nm, пропорциональному концентрации одного из продуктов (ацетат), в условиях ингибирования бутирилхолинэстеразы. Измерения скорости реакции, катализируемой AChE, проводили на спектрофотометре Perkin-Elmer (USA) в 1 см термостатируемой кювете при 36°C . В опытах по определению границ стационарности реакции записывали полные кинетические кривые $A(t)$ от начала реакции до выхода на плато. Текущие скорости реакции ($v = \Delta A / \Delta t$) рассчитывали как касательные к кинетической кривой в определенной точке. В опытах по определению констант ингибирования определяли начальные скорости реакции по наклону линейного участка кинетической кривой $A(t)$, в интервал времени от 5 до 30 с от начала реакции. Концентрацию белка в экстрактах определяли по методу Брэдфорда [5]. pH растворов определяли на pH-метре OP-204/1 с точностью 0,02 ед. в термостатируемой ячейке при 36°C . Результаты и их обсуждение с целью определения квазистационарных условий реакции, регистрируемой по методу Элмана, нами были записаны полные кинетические кривые $A(t)$ от начала реакции ($t \sim 0$) до выхода на плато, при этом скорость реакции $\Delta A / \Delta t$ определяли вдоль всей кинетической кривой. На рис.1 и 2 представлены полные кинетические кривые $A(t)$ реакции, катализируемой AChE из экстрактов головного мозга и мышцы EDL крысы, полученные усреднением по данным 11 независимых биологических экспериментов при трех повторных регистрациях. Как видно из рис. 1 и 2, реакция в случае экстрактов из EDL и головного мозга стационарна как минимум в течение 5 минут. Относительное содержание AChE к общему белку, очевидно, выше в экстрактах головного мозга, однако, как видно из рисунка, наиболее выражена стабильность реакции

катализируемой AChE из мышцы EDL. Данную особенность кинетического поведения реакции из EDL можно объяснить структурными различиями якорных белков, *in vivo* присоединяющих AChE к постсинаптической мембране в мышцах и мозге [6,7]. Несмотря на консервативность активного центра и практически отсутствие различий в первичной последовательности и пространственной структуре AChE из различных органов, время выхода на плато кинетических кривых, описывающих ферментативную реакцию AChE, различается для мышц, мозга (рис.1 и 2) и, как показано ранее [7] сердца. Возможно, что различие в длительности квазистационарного участка ферментативной реакции AChE для разных органов связано с тем, что AChE работает в клетках в виде ассоциатов из мономеров, димеров и тетрамеров AChE с различными коллагеноподобными белками, для нервно-мышечного синапса – это ColQ, для головного мозга – Prima (пролинбогатый белок). Причем в мышцах 1, 2 или 3 тетрамера AChE могут связываться с тремя переплетенными коллагеноподобными «хвостами» (Col Q), образуя ассиметричные формы AChE, обозначаемые G2, G4 и A12, в зависимости от числа мономеров AChE [5].

Рис. 1 – Экспериментальные кривые реакции гидролиза ацетилтиохолина эстеразой AChE, содержащейся в экстрактах головного мозга и *m. extensor digitorum longus* (EDL): К-фосфатный буфер, $2 \cdot 10^{-5}$ М iso-OMPA, общий белок 1 мг/мл, pH 8.0; 36°C

Рис. 2 – Зависимость скорости реакции, катализируемой AChE из экстрактов, от времени регистрации реакции

Поскольку AChE из головного мозга и мышцы является сложной молекулой – гетероолигомером, в которой присутствуют различающиеся по составу и форме пролин - богатые коллагеновые структуры (ColQ в локомоторных мышцах и PRIMA в головном мозге), мы решили проверить влияние C-547 на активность AChE после разрушения коллагеноподобных структур в результате разрезания их коллагеназой. Фермент коллагеназу (КФ 3.4.24.7) брали в концентрации 0,2 мг/мл и инкубировали с экстрактами EDL и мозга крыс различное время до запуска реакции ацетилтиохолином. Использовали реакционную среду: 5 мМ ATCh, 10 мМ DTNB, $2 \cdot 10^{-5}$ М iso-OMPA, 0,1 М К-фосфатный буфер, pH 8,0, $t = 36$ °C. Как следует из приведенных нами данных (табл. 1), активность AChE под действием коллагеназы в экстрактах из мышцы EDL уменьшается в 2 раза за время прединкубации 30 минут. Этот результат косвенно подтверждает наше предположение [7] о существенной роли коллагенового хвоста в олигомере AChE в экстрактах из EDL.

Таблица 1 – Начальная скорость реакции AChE в локомоторной мышце EDL и мозге в зависимости от времени инкубации с коллагеназой (0,2 мг/мл) орган или ткань крысы реакция без коллагеназы коллагеназа 20 минут коллагеназа 30 минут

Орган/Ткань	реакция без коллагеназы	коллагеназа 20 минут	коллагеназа 30 минут
головной мозг	$0.0761 \pm 0,002$	$0.0759 \pm 0,002$	$0.0558 \pm 0,003$
EDL	$0.0678 \pm 0,003$	$0.0601 \pm 0,002$	$0.0349 \pm 0,003$

Как показано ранее [8], белок ColQ (коллагеновый хвост AChE) заякоривается в постсинаптической мембраной нервно-мышечного синапса, и имеет 8 вариантов альтернативного сплайсинга а, кроме того, множество мутаций, каждая из

которых приводит к серьезным заболеваниям - миопатиям и миостениям. Очевидно, что AChE, поскольку она находится на внешней стороне мембраны синапса, функционирует в условиях высоких локальных концентраций ионов, причем AChE не относится к мембрансвязанным ферментам - она не интегрирована с мембраной, а прикрепляется за счет ColQ. AChE является внеклеточным белком, поскольку функционирует в синаптической щели. Попробуем оценить, что может значительно влиять на скорость реакции, катализируемого AChE *in vivo*. Одним из самых сильных вариантов регуляции активности AChE в EDL может служить регуляция трехмерного пространственного расположения глобулы AChE в гетероолигомере, образованном с молекулой ColQ. В этом случае 1 молекула ингибитора, занимающая положение вблизи контакта AChE с пролин-богатой областью ColQ, способна повлиять на активность $4 \times 3 = 12$ глобул AChE, что может привести к чрезвычайно высокой чувствительности AChE в форме A12 преимущественно присутствующей в EDL. В пользу высказанного предположения косвенно свидетельствует, результат сравнительного анализа участка структуры ColQ и PRIMA, непосредственно контактирующего с WAP (W-W-W-триптофан богатой) областью AChE в гетероолигомерах A12 для EDL и G4 для головного мозга. Последовательности ColQ и PRIMA выравниваются вне участка контакта с AChE (вне W-W-W триптофан богатой области AChE) [8]. В области WAP контакта AChE с Prima имеется повторность из 10 циклизующихся не заряженных пролинов, тогда как контакт WAP AChE с ColQ со стороны ColQ содержит три пролина (p), три гидрофобных фенилаланина (f), зараженный положительно аргинин (r) и заряженный отрицательно (s) серин. Аминокислотная последовательность ColQ и Prima соответствующая контакту с WAP областью AChE: 60 pppppppppppr Prima 61 lfpppff r g s ColQ Сравнение аминокислотной последовательности показывает, что ColQ в области контакта с AChE имеет дополнительную (по сравнению с Prima) возможность присоединения какого-либо соединения к зарядам «гуанидиновой вилки» аргинина (r) и отрицательного серина (s), находящихся в гидрофобной области, образованной 3 фенилаланинами (f) [9]. Соседняя область, граничащая с контактом с WAP AChE, также несколько отличается: 50 icqsrpprrpl Prima 51 scllmrrpprr ColQ Выделенный 59 остаток циклического (p) пролина крайне важен для образования AChE комплексов с Prima и ColQ: показано, что аминокислотная замена этого остатка приводит к разрушению гетероолигомеров A12 и G4 [10]. С целью обнаружения возможных кинетических различий связанных со структурным различием в коллагеновой части AChE из двигательной мышцы EDL и AChE из мозга крысы, было исследовано влияние на реакцию в экстрактах неспецифического ингибитора прозерина (неостигмин). На рис. 3 показан график зависимости начальной скорости реакции, определенной на квазистационарном линейном участке кривой A(t) в зависимости от концентрации субстрата ацетилтиохолина в условиях ингибирования

прозерин. Определенная нами в координатах Лайнуивера-Берка константа ингибирования ацетилхолинэстеразы из EDL по порядку величины совпадает с полученным ранее в электрофизиологии значением [6] и составляет $KI(\text{прозерин})=0,4 \cdot 10^{-5} \text{ М}$. Рис. 3 – Зависимость начальной скорости реакции, катализируемой эстеразой из экстракта EDL крысы от концентрации субстрата ацетилтиохолина: 1) кинетическая кривая реакции в К-фосфатном буфере, pH 8.0; 36° С, без ингибиторов; 2) реакция в тех же условиях в присутствии $2 \cdot 10^{-5} \text{ М iso-OMPA}$; 3) $2 \cdot 10^{-5} \text{ М iso-OMPA}$ и $10^{-5} \text{ М прозерина}$; 4) $2 \cdot 10^{-5} \text{ М iso-OMPA}$ и $5 \cdot 10^{-5} \text{ М прозерина}$. На следующем графике (рис. 4) показана зависимость начальной скорости реакции, катализируемой AChE мозга крысы в клеточном экстракте от концентрации субстрата ацетилтиохолина при различных концентрациях ингибитора прозерина. Для мозга экспериментально найденная константа ингибирования прозерин AChE практически совпадает с аналогичной константой для двигательной мышцы EDL, и составляет $KI(\text{прозерин}) = 0,43 \cdot 10^{-5} \text{ М}$. Полученные кинетические данные показывают неспецифичность действия прозерина на AChE из локомоторной мышцы EDL и головного мозга крысы. Рис. 4 – Зависимость начальной скорости реакции, катализируемой эстеразами мозга крысы от концентрации субстрата ацетилтиохолина при различных концентрациях ингибиторов: 1) без ингибиторов; 2) $2 \cdot 10^{-5} \text{ М iso-OMPA}$; 3) $0,3 \cdot 10^{-7} \text{ М прозерин}$, $2 \cdot 10^{-5} \text{ М iso-OMPA}$; 4) $0,5 \cdot 10^{-4} \text{ М прозерин}$, $2 \cdot 10^{-5} \text{ М iso-OMPA}$; 5) $0,3 \cdot 10^{-4} \text{ М прозерин}$, $2 \cdot 10^{-5} \text{ М iso-OMPA}$; $0,05 \text{ М К-фосфат}$, pH 8,0; 36°С Автор благодарит К.А. Петрова (ИОФХ РАН им. А.Е.Арбузова, Казань) за предоставление образцов и участие в постановке задачи и Э.А. Бухараеву (КГМУ, Казань) за участие в обсуждении результатов.