

Расщепление новокаина нативной и иммобилизованной ацетилхолинэстеразой электрического органа электрического угря (*acetylcholinesterase from electroporus electricum (electric eel)*) для определения метаболизма

Паентко В.В.¹, Богданова Н.А.², Матрунчик Ю.В.³, Матковский А.К.¹, Зуб Ю.Л.¹

¹Институт химии поверхности имени А.А.Чуйко НАН Украины

²Институт физиологии имени А.А. Богомольца НАН Украины

³Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси

В статье описана возможность использования гетерогенизированных препаратов ферментов для прогнозирования возможности метаболизма обезболивающих средств

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, новокаин, метаболизм

Создание и внедрение в практику новых противоболевых препаратов предполагает их апробацию на животных [1]. Использование гетерогенизированных ферментативных препаратов позволяет осуществить экспресс-оценку возможности метаболизма действующих веществ некоторых препаратов (напр., прокаина), что дает возможность избежать таких дорогостоящих и длительных исследований. Цель нашей работы состояла в том, чтобы выяснить возможность использования подобных систем для тестирования обезболивающих лекарств на примере Новокаина. В качестве объектов исследования нами были выбрана ацетилхолинэстераза (АХЭ) электрического органа электрического угря (*Acetylcholinesterase from Electroporus electricum (electric eel)*) в свободном и иммобилизованном состоянии. Этот фермент является типичным, по свойствам похож на АХЭ эритроцитов крови человека, также представляет собой интересный объект исследования, так как обладает очень высокой каталитической активностью [2].

Экспериментальная часть

Для синтеза композитов использовали следующие материалы: силикат натрия (хч), гидратированная кремниевая кислота (ч) (Реахим), гидроаккумулирующий комплекс на основе поливинилового спирта и полиакриловой кислоты [3,4], Реосорбилакт (Юрия-фарм), 1н раствор HCl (хч), 0,02 н NaOH, раствор АХЭ электрического органа электрического угря (*Acetylcholinesterase from Electroporus electricum (electric eel)*) (Sigma-Aldrich), 0,067М раствор Na,K-фосфатного буфера (pH=6), ацетилхолинхлорид (фарм) (Sigma-Aldrich), Новокаин (Дарница), Прозерин (Дарница), 0,09% раствор хлорида натрия (фарм), Прозерин (Дарница), KBr (хч).

Исследование ферментативного расщепления ацетилхолинхлорида и прокаина проводилось потенциометрически: кислотно-основным титрованием и нитритометрией.

Синтез материалов с иммобилизованной АХЭ. При иммобилизации АХЭ вводилась в полимерную оболочку на основе поливинилового спирта и полиакриловой кислоты с последующим внедрением в кремнеземную матрицу золь-гель методом [5]. В процессе гетерогенизации в систему добавлялись различные буферные растворы, обеспечивающих стабильность показателей иммобилизованного фермента. В одном случае использовали 0,067М раствор Na,K-фосфатного буфера (pH=6) (обр.1, табл.1), в другом - буфер, который был приготовлен с участием плазмозаменивателя Реосорбилакт (1:200) (обр.2, табл.1).

Определение активности нативной и иммобилизованной холинэстеразы (ХЭ) в реакции расщепления ацетилхолинхлорида.

Каталитическая активность всех полученных образцов изучалась в реакции гидролиза ацетилхолинхлорида (оптимального субстрата ХЭ) [6,7]. 4 мМ раствор субстрата готовили непосредственно перед исследованием в 350 см³ дистиллированной воды с добавлением 10 см³ 1,6 М раствора MgCl₂ и 40 см³ 1 М раствора NaCl. Потом его инкубировали на протяжении 10 мин. при 37°C, после чего pH доводили до 8,3 добавлением 0,02 н NaOH. Затем вводили 0.4 см³ раствора фермента либо 0.030–0.033 г ферментсодержащего препарата. Фиксировали время реакции, за которое величина pH достигает значение, равное 8.0 Активность ХЭ определяли по количеству образовавшегося продукта реакции – уксусной кислоты (см. схему 1) за единицу времени. Количество выделившейся кислоты за соответствующие проме-

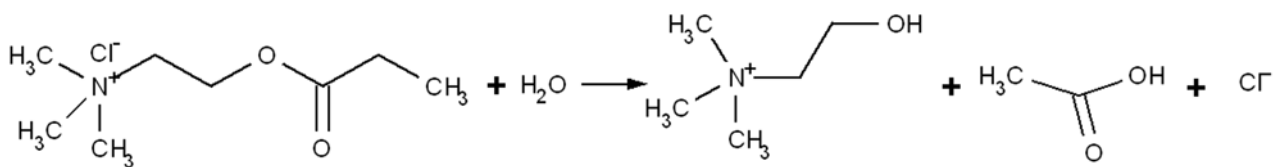


Схема 1

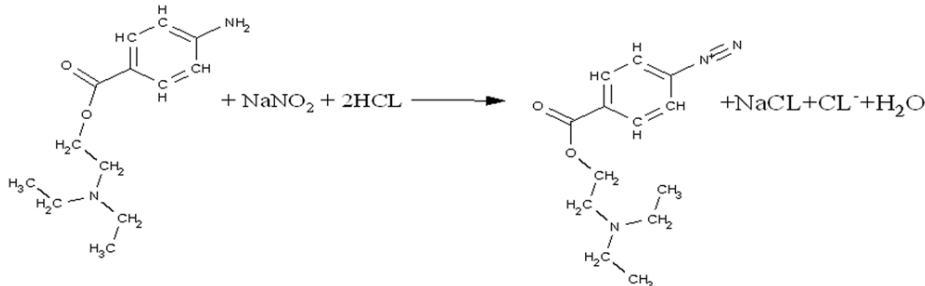


Схема 2

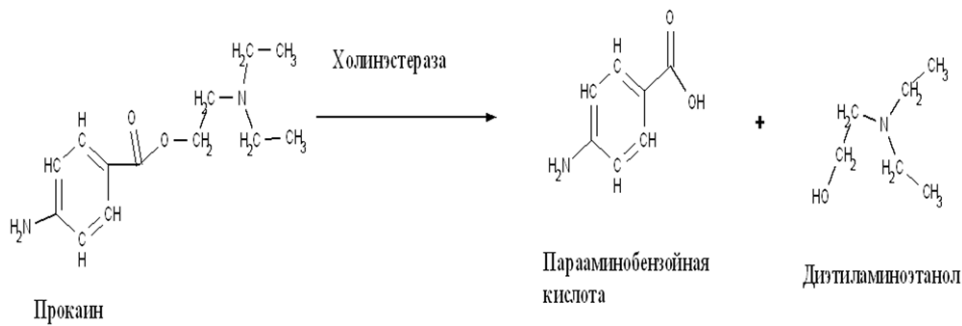


Схема 3

жутки времени устанавливали методом потенциометрического титрования 0,02н раствором NaOH на высокоточном титраторе АТП-02 ("Аквилон", РФ). За единицу активности принимается количество прогидролизовавшего субстрата в течении 1 мин при рН 8.0 и 37°С [6,7].

В таблице 1 приведены значения активности препаратов с иммобилизованной ХЭ.

Образец	Активность иммобилизованной холинэстеразы (ед\мг)
1	2,15±0,01
2	2,42±0,02
* активность нативной АХЭ составляла 1,84±0,01 ед\мг	

Таблица 1. Холинэстеразная активность иммобилизованной холинэстеразы*

Изменение рН во времени в процессе расщепления прокаина измеряли на автоматическом титраторе АТП-02(Москва, «Аквилон»). В основе определения лежит метод нитритометрии, суть которого состоит в количественном взаимодей-

ствии нитрита натрия с первичной аминогруппой ароматического кольца прокаина с образованием соли диазония (схема 2) [8].

Проведение кинетических исследований процесса позволило оценить активность нативной и иммобилизованной ХЭ в реакции расщепления прокаина (схема 3).

Подготовка субстрата (прокаина) состояла в его растворении в 0,09% растворе NaCl. Об активности судили по константе скорости ферментативной реакции.

Растворы фермента (или иммобилизованный препарат) и субстрата инкубировали 10 мин. при 37°С, далее быстро смешивали. Реакцию останавливали через выбранные промежутки времени путем добавления прозерина. Далее добавляли 2 см³ 0,1н раствора HCl, 0,2 г KBr, доводили дистиллированной водой до 50 см³ и титровали 0,05 н NaNO₂ при 15-20°С. Точку эквивалентности фиксировали потенциометрически.

Были рассчитаны константы скорости реакции гидролиза прокаина, являющиеся мерой активности фермента. Полученные экспериментальные данные представлены в табл. 2.

Образец	$K, \text{мг} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	R^2
АХЭ электрического органа электрического угря (Acetylcholinesterase from <i>Electroporus electricum</i> (electric eel))	0,2574	0,9755
1	0,3248	0.9902
2	-	-

Таблица 2. Константы скорости реакции холинэстеразного гидролиза прокаина

Результаты и их обсуждение

Обнаружено, что активность обоих иммобилизованных препаратов выше, чем нативного. Образец, полученный при добавлении фосфатного буфера, обеспечивает хорошо контролируруемую скорость протекания процесса в исследуемой реакции. Введение раствора Реосорбилакта чрезмерно повышает скорость процесса, что затрудняет само исследование как кинетического процесса, так и применение в аналитическом определении субстратов.

Для определения констант скоростей (K) реакции гидролиза прокаина были построены графические зависимости количества непрогидролизованного прокаина от времени протекания процесса (рис. 1). Как видно из этого рисунка, во всех случаях экспериментальные точки удовлетворительно ложатся на прямую, что свидетельствует о независимости скорости реакции (V) от времени (τ). Следовательно, реакция имеет нулевой порядок и скорость реакции не зависит от времени.

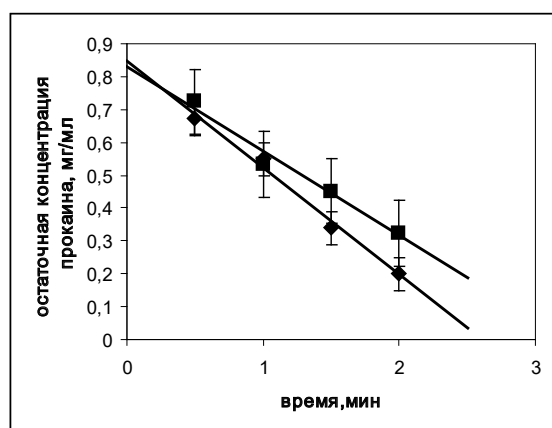


Рис. 1. Зависимость количества прогидролизованного прокаина от времени реакции: ■ - нативный препарат, ◆-образец 1

Выводы

Показано, что иммобилизованная АХЭ электрического органа электрического угря (*Acetylcholinesterase from Electroporus electricum* (electric eel)) (образец 1) обладает большей активностью по сравнению с нативной, что подтверждено кислотно-основным титрованием по ацетилхолинхлориду и нитритометрией по прокаину. Введение Реосорбилакта при синтезе существенно повышает активность иммобилизованного препарата АХЭ (образец 2) при расщеплении прокаина. В этом случае проведение кинетических измерений методом нитритометрии затруднительно. Иммобилизованный препарат АХЭ, синтезированный с использованием фосфатного буфера, продемонстрировал устойчивые характеристики при определении активности обоими методами, потому является перспективным для разработки методик изучения возможности метаболизма обезболивающих средств.

Литература

1. Государственная Фармакопея Украины. Дополнение 1-Х.: РИРЕГ -576с.
2. А.П.Бресткин, А.П.Кузнецова Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. — Владивосток.:Высшая школа, 1997. — 348с.
3. Матрунчик, Ю.В. Гидроаккумулирующий полимерный комплекс на основе полиакриловой кислоты и поливинилового спирта / Ю.В. Матрунчик, Е.В. Воробьева, И.И. Басалыга, Н.П. Крутько // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. — 2008. — № 4. — С. 81–84.
4. Матрунчик, Ю.В. Гидроаккумулирующие материалы на основе полимерных комплексов / Ю.В. Матрунчик, Е.В. Воробьева, Н.П. Крутько // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: тез. докл. — Москва, 23-28 сентября. 2007. — В 5 т. — Т. 3. — С.
5. Паентко В.В., Матковский А.К., Юрченко Г.Р., Зуб Ю.Л. Получение золь-гель методом композитов на основе кремнезема, желатина и гомогената печени курицы домашней *Gallus gallus* // Хімія, фізика і технологія поверхні.—2012.—Т.3.—№1.—с.108-113
6. Яковлев В.А. Кинетика ферментативного катализа. — М.: Химия. —1965.—458с
7. Enzymatic Assay of cholinesterase, acetyl (EC 3.1.1.7.-1993.—Reagent Chemicals ACS Specifications. —85 p
8. Государственная Фармакопея Украины. Дополнение 2-Х.: РИРЕГ - 485с.

Novocain splitting by native and immobilized Acetylcholinesterase from *Electroporus electricum* (electric eel) as means of metabolism estimation

Payentko V.V.¹, Bogdanova N.A.², Matrunchik Yu.V.³, Matkovsky A.K.¹, Zub Yu.L.¹

The possibility of using heterogeneous preparations of ferments feor prediction of esthetizations agents metabolism have been discussed in present work

Key words: acetylcholinesterase, novocain, metabolism

Розщеплення новокаїну нативною та іммобілізованою ацетилхолінестеразою електричного органу електричного вугра *Acetylcholinesterase from *Electroporus electricum* (electric eel)*

Паянтко В.В.¹, Богданова Н.О.², Матрунчик Ю.В.³, Матковський О.К.¹, Зуб Ю.Л.¹

В статті описано можливість використання гетерогенізованих препаратів ферментів для прогнозування можливості метаболізму знеболювальних лікарських препаратів

Ключові слова: ацетилхолінестераза, новокаїн, метаболізм
