



УДК 577.311\*7.042:577.354.3:577.112.4

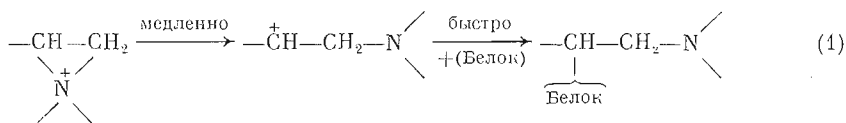
## КИНЕТИКА РЕАКЦИИ N,N-ДИМЕТИЛ-2-ФЕНИЛАЗИРИДИНИЯ С МУСКАРИНОВЫМ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОМ И АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗАМИ

*Палумма П. Я., Кяэembre Т. Х., Ярв Я. Л.*

*Тартуский государственный университет*

Изучена кинетика реакции N,N-диметил-2-фенилазиридиния с ацетилхолинэстеразами электрического органа электрического угря и яда кобры, а также с мембраносвязанными мускариновым холинорецептором и ацетилхолинэстеразой мозга крысы. Процесс инактивации ферментов и холинорецептора включает в себя стадии нековалентного связывания ингибитора и последующее необратимое алкилирование некоторой группы белка, располагающейся, вероятно, в районе анионного центра связывания. В кинетическом анализе учтен спонтанный гидролиз азиридиниевого ингибитора и возможность обратимого связывания продукта гидролиза с ферментами. Выяснено, что при практически одинаковой эффективности нековалентного связывания ионов азиридиния в активном центре ацетилхолинэстераз и мускаринового холинорецептора последний белок алкилируется более чем в 10 раз быстрее, что можно объяснить разными сольватационными свойствами активных центров ферментов и рецептора. Изучено влияние пяти растворителей на скорость разложения азиридиниевого соединения. Результаты показывают, что решающую роль в ускорении реакции сольволиза N,N-диметил-2-фенилазиридиния играет основность растворителя.

Участвующие в ацетилхолиновом механизме передачи нервного импульса ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) и холинорецепторы эффективно взаимодействуют с молекулой ацетилхолина, выполняющей роль медиатора в синапсе [1]. Общепринято, что важное значение в процессе молекулярного узнавания ацетилхолина имеет взаимодействие катионной группы холинового остатка молекулы медиатора с так называемым анионным центром связывания на активной поверхности холинорецепторов [2] и ферментов [3]. Для сопоставления свойств анионных центров этих разных по своим функциям белков можно использовать модификацию белков селективными по отношению к соответствующим центрам связывания реагентами. В случае ацетилхолинсвязывающих белков селективность действия обеспечивается наличием в молекуле модификатора катионного заряда, чаще всего аммониевой группировки. К таким модификаторам относятся азиридиниевые ионы, способные алкилировать некоторую функциональную группу активного центра белков. Подобная реакция алкилирования протекает путем образования карбониевого иона согласно механизму S<sub>N</sub>1 [4]



В настоящей работе изучена кинетика реакции ионов N,N-диметил-2-фенилазиридиния с разными ацетилхолинэстеразами и холинорецептором мускаринового типа. Этот рецептор, как и ацетилхолинэстеразы, проявляет специфичность относительно низкомолекулярных лигандов и не взаимодействует с белковыми токсинами, что характерно для ацетилхолинового рецептора никотинового типа [5]. В кинетическом анализе процесса алкилирования белков была также учтена реакция гидролитического разложения азиридиниевого соединения (см. схемы (2)–(4)). По имеющимся данным, скорость этого процесса сравнима со скоростью алкилиро-

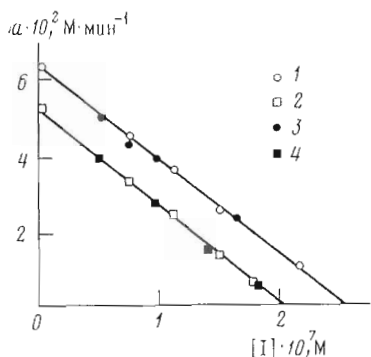


Рис. 1

Рис. 1. Молекулярная активность ацетилхолинэстеразы яда кобры при титровании фосфорорганическими ингибиторами  $(C_2H_5O)_2P(O)OC_6H_4NO_2$  (1, 2) и  $[(C_2H_5O)_2P(O) \cdot SC_2H_4S^+(CH_3)C_2H_5]CH_3SO_4^-$  (3, 4) до реакции фермента с азиридиновым ионом (1, 2) и после частичной инактивации фермента (2, 4)

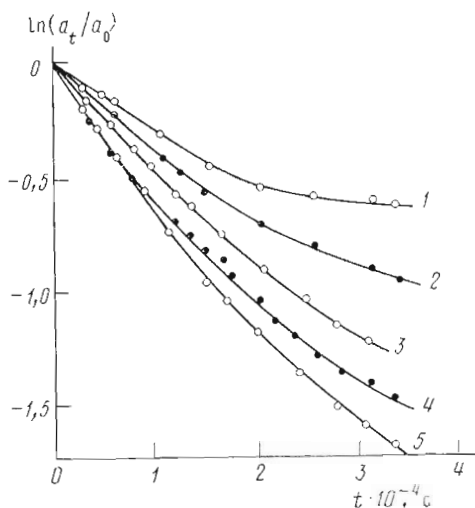


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика алкилирования ацетилхолинэстеразы яда кобры ионами  $N,N$ -диметил-2-фенилазиридиния. Концентрации ингибитора (мкМ): 25 (1), 50 (2), 104 (3), 200 (4), 519 (5)

вания ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека [6] и со скоростью алкилирования бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади [7]. В разбавленном водном растворе продуктом спонтанного гидролиза азиридинового иона является аминоспирт, который в кислой и нейтральной средах в значительной степени протонирован и может также взаимодействовать с анионным центром рецептора или фермента, защищая таким образом белки от дальнейшего алкилирующего действия азиридиновых ионов. Такой защитный эффект продукта гидролиза азиридиновых ионов проявляется в кинетике алкилирования бутирилхолинэстеразы сыворотки [7], что осложняет кинетический анализ этой реакции. При этом общую кинетическую схему процесса можно выписать в следующем виде:



где  $E$  — фермент (или рецептор),  $I$  и  $I^*$  — алкилирующий реагент (ионы азиридиния) и продукт его гидролиза,  $EI$  и  $EI'$  — нековалентные обратимые комплексы фермента с лигандами, а  $EI'$  — модифицированный белок. В условиях эксперимента, где  $[E]_0 \ll [I]_0$ , кинетическое уравнение скорости реакции ингибирования фермента можно интегрировать:

$$\ln \frac{[E]_0}{[E]_0 - [EI']} = \frac{k_a}{k} \ln \frac{\frac{K_i}{[I]_0} + 1}{\frac{K_i}{[I]_0} + \frac{K_i}{K_i^*} + \left(1 - \frac{K_i}{K_i^*}\right)^{-1} e^{-kt}}. \quad (5)$$

Полученное уравнение использовали для расчета кинетических параметров  $K_i$ ,  $K_i^*$ ,  $k_a$  и  $k$ , обрабатывая кинетические данные на ЭВМ методом нелинейных наименьших квадратов. При этом для упрощения процедуры расчета и уменьшения машинного времени оказалось целесообразным зафиксировать величину константы гидролиза,  $k$ . Из отдельных опытов

Параметры алкилирования ацетилхолинэстераз и мускаринового холинорецептора N,N-диметил-2-фенилазиридинием  
25° С, 0,15 М фосфатный буфер, рН 7,5

Белок	[I] <sub>0</sub> , мМ	K <sub>1</sub> , мкМ	K <sub>1</sub> <sup>*</sup> , мМ	k <sub>a</sub> · 10 <sup>4</sup> , с <sup>-1</sup>
Ацетилхолинэстераза яда кобры	0,02–0,52	19±3	0,95±0,25	0,7±0,2
электрического угря	0,02–0,52	23±6	0,85±0,15	1,2±0,3
коры мозга крыс	0,05–0,3	40±20	0,50±0,32	1,8±0,7
эритроцитов быка *	0,025–0,25	59 **	—	2,9
Мускариновый холинорецептор мозга крыс	0,05–0,12	50±30	—	15±6

\* Данные работы [6]: 0,04 М MgCl<sub>2</sub>, 0,05 М NaCl, рН 7,40; 25° С.

\*\* В работе [15] K<sub>1</sub> = 6,0 · 10<sup>-5</sup> М (субстрат — ацетилхолин, неконкурентный тип ингибирования).

было получено  $k = (1,02 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$ , с<sup>-1</sup> (0,15 М фосфатный буфер, 25° С, рН 7,5) [7].

В настоящей работе изучали кинетику алкилирования трех ацетилхолинэстераз: растворимых ферментов из яда кобры и электрического органа электрического угря, а также мембраносвязанного фермента из коры больших полушарий мозга крыс. В последнем случае использовали суспензию мозговых мембран в реакционном буфере. Инкубация ферментов с азиридиновым соединением приводила к их необратимой и прогрессирующей во времени инактивации. Субстратом служил ацетилтихолин. Титрование ацетилхолинэстеразы из яда кобры двумя фосфорорганическими ингибиторами, (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>2</sub>P(O)OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> и [(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>2</sub>P(O)SC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> · (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, до реакции алкилирования и после частичной модификации белка показало, что молекулярная активность фермента в процессе алкилирования не меняется и наблюдаемое в опыте уменьшение скорости реакции связано с уменьшением концентрации активных центров (рис. 1). Учитывая это, получим

$$\frac{[E]_0}{[E]_0 - [E]_t} = \frac{a_0}{a_t}, \quad (6)$$

где a<sub>0</sub> и a<sub>t</sub> — активность фермента до реакции алкилирования и через промежуток времени t с момента добавления азиридинового ингибитора. Активность ферментов определяли после 300-кратного разбавления реакционной смеси при оптимальной концентрации субстрата.

Согласно уравнениям (5) и (6), кинетические данные обрабатывали на ЭВМ в виде функции ln(a<sub>0</sub>/a<sub>t</sub>) от двух переменных: [I]<sub>0</sub> и t. Из рис. 2 видно, что временной ход процесса алкилирования ацетилхолинэстераз при разных начальных концентрациях азиридинового иона описывается рядом кривых, при этом процесс алкилирования ацетилхолинэстераз явно не подчиняется кинетике реакции первого (псевдопервого) порядка. Тем не менее известны попытки применения констант скорости реакции псевдопервого порядка в анализе кинетики реакции ионов N,N-диметил-2-фенилазиридиния с холинэстеразами. Так, в работе [8] игнорировались побочные процессы, описываемые уравнениями (3) и (4) в общей кинетической схеме (2–4).

Результаты обработки кинетических данных согласно уравнению (5) показывают (табл. 1), что изученные три фермента характеризуются весьма близкими кинетическими параметрами, включая и константы K<sub>1</sub><sup>\*</sup>. При этом для всех трех ацетилхолинэстераз K<sub>1</sub> ≪ K<sub>1</sub><sup>\*</sup>. Следовательно, равновесие (4) мало влияет на наблюдаемую кинетику реакции алкилирования и при первом приближении может быть опущено в анализе кинетических данных. Предполагая, что такое же соотношение констант K<sub>1</sub> и K<sup>\*</sup> характерно и для ацетилхолинэстеразы эритроцитов быка, в табл. 1 мы включили также литературные данные для этого фермента, полученные с учетом

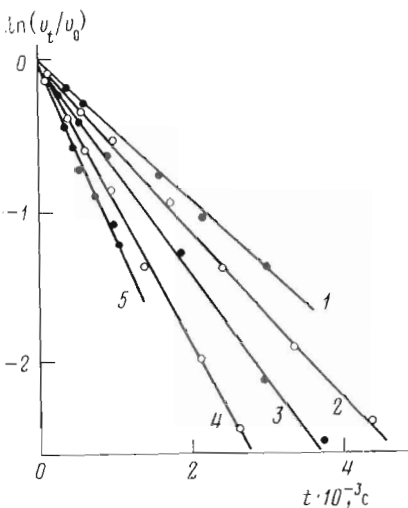


Рис. 3

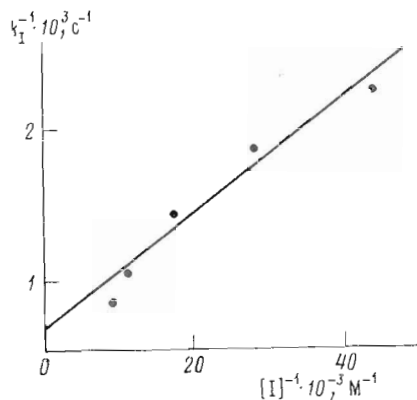


Рис. 4

Рис. 3. Кинетика алкилирования мускаринового холинорецептора ионами  $N,N$ -диметил-2-фенилазиридиния. Концентрации ингибитора (мкМ): 23 (1), 36 (2), 59 (3), 92 (4), 114 (5)

Рис. 4. Зависимость константы скорости алкилирования мускаринового холинорецептора ( $k_I$ ) от концентрации  $N,N$ -диметил-2-фенилазиридиния (I)

реакций (2) и (3) [6]. Несмотря на некоторые различия в условиях эксперимента, эти данные достаточно хорошо согласуются с результатами для изученных в этой работе ацетилхолинэстераз.

Для определения мускаринового холинорецептора в суспензии мозговых мембран использовали меченный тритием до высокой удельной активности хинуклидинилбензилат [9]. В предварительных опытах было показано, что при обработке ионами азиридиния препарат мускаринового холинорецептора теряет способность связывать [ $^3\text{H}$ ]хинуклидинилбензилат. Аналогичная реакция ингибирования рецептора наблюдается также в случае бензилилхолинпиприта [10] и некоторых других реагентов, образующих в водной среде азиридиниевые циклы [11, 12]. Текущую концентрацию рецептора в ходе реакции алкилирования контролировали кинетическим методом, определяя начальную скорость образования комплекса белка с [ $^3\text{H}$ ]хинуклидинилбензилатом. Существенным преимуществом кинетического метода перед равновесным связыванием [ $^3\text{H}$ ]хинуклидинилбензилата является быстрота определения: одно определение можно провести в течение 2-3 мин, а не за 1-2 ч [13].

Опыты показали, что мускариновый холинорецептор взаимодействует с ионами  $N,N$ -диметил-2-фенилазиридиния значительно быстрее, чем холинэстеразы, и практически полной инактивации рецептора можно достигнуть уже в течение 1 ч. Это значительно упрощает кинетический анализ процесса, так как за это время спонтанным разложением азиридиниевого ингибитора можно пренебречь. В таких условиях алкилирование рецептора при избытке ингибитора описывается в соответствии с реакционной схемой (2) кинетическим уравнением реакции первого порядка:

$$\ln \frac{v_0}{v_t} = k_I \cdot t, \quad (7)$$

где  $k_I = \frac{k_a [I]_0}{K_i + [I]_0}$ ,  $v_0$  и  $v_t$  — начальная скорость связывания [ $^3\text{H}$ ]хинуклидинилбензилата с рецептором в моменты времени  $t=0$  и  $t$ . Уравнение (7) хорошо описывает полученные кинетические кривые и допускает определение констант скорости реакций первого порядка  $k_I$  при разных

Скорость разложения N,N-диметил-2-фенилазиридиния при 25° С в различных растворителях

Растворитель	$\epsilon^*$ (20° С) [14]	$B^*$ [14]	$\lg(k^{орг}, c^{-1})^{**}$
Диметилсульфоксид	48,9	362	-2,00±0,040
Диметилформамид	36,7	291	-2,50±0,03
Этанол	24,3	235	-2,85±0,04
1,4-Диоксан	2,21	237	-3,23±0,05
Уксусная кислота	6,15	139	-4,20±0,05
Вода	80,1	159	-4,12***; -4,00****

\* Значения  $\epsilon$  и  $B$  характеризуют диэлектрическую проницаемость растворителя и его общую основность.

\*\*  $\lg k^{орг}$  вычислены при экстраполяции к нулевой концентрации воды линейных зависимостей  $\lg k^{орг}$  разложения N,N-диметил-2-фенилазиридиния от концентрации воды в присутствии водных органических растворителей.

\*\*\* Из работы [6]: 0,04 М MgCl<sub>2</sub>, 0,05 М NaCl, pH 7,40.

\*\*\*\* Из работы [7]: 0,15 М фосфатный буфер, pH 7,50.

начальных концентрациях ингибитора (рис. 3). По этим данным можно рассчитать также константы  $K_i$  и  $k_a$  реакционной схемы (2), используя, например, линейную зависимость  $1/k_I$  от  $1/[I]_0$  (рис. 4):

$$\frac{1}{k_I} = \frac{1}{k_a} + \frac{K_i}{k_a [I]_0} \quad (8)$$

Полученные результаты приведены в табл. 1.

Как вытекает из табл. 1, четкая разница в кинетических закономерностях взаимодействия ионов N,N-диметил-2-фенилазиридиния с ацетилхолинэстеразами и с мускариновым холинорецептором связана только со стадией алкилирования, так как эффективность нековалентного связывания ингибитора с этими белками оказывается весьма близкой. Согласно имеющимся представлениям о механизме реакции алкилирования, общая скорость этого процесса определяется стадией разложения азиридиниевого соединения до карбониевого иона, который затем быстро взаимодействует с неким нуклеофильным остатком белка (см. схему (1)). В таких условиях скорость алкилирования не зависит от природы и концентрации нуклеофила и только эффекты реакционной среды, влияющие на образование карбониевого иона, могут изменять величину  $k_a$ .

Так как аналогичные закономерности характеризуют также реакцию спонтанного разложения азиридиниевого соединения, в настоящей работе было изучено влияние ряда растворителей на кинетику разложения с целью конкретизации факторов, определяющих реакционную способность этого реагента. Оказалось, что добавление в реакционную среду диметилсульфоксида, диметилформамида, этанола и 1,4-диоксана ускоряет реакцию, тогда как уксусная кислота практически не влияет на скорость процесса (рис. 5). Согласно работе [4], добавление ацетона в реакционную среду также приводит к ускорению реакции гидролиза азиридиниевых соединений. Это объясняется уменьшением диэлектрической проницаемости (полярности) реакционной среды. Однако из результатов настоящей работы следует, что константы скорости не описываются какой-либо единой функцией макроскопической диэлектрической проницаемости среды. В то же время наблюдаются четкие линейные зависимости  $\lg k$  от молярной концентрации органического растворителя в реакционной смеси (рис. 5). Аналогично можно получить линейные зависимости  $\lg k$  от концентрации воды в реакционной среде. Однако в этом случае наклоны зависимостей отрицательные. Существование таких закономерностей допускает экстраполяцию  $\lg k$  к нулевой концентрации воды, т. е. в чистый растворитель. Вычисленные таким образом значения  $\lg k^{орг}$  приведены в табл. 2. Следует отметить, что непосредственное определение этих

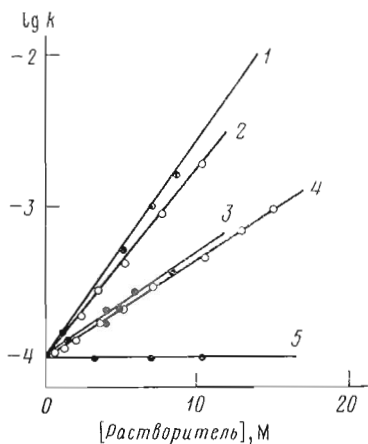


Рис. 5

Рис. 5. Кинетика разложения азиридиниевого иона в водной среде в присутствии диметилсульфоксида (1), диметилформамида (2), этилового спирта (3), диоксана (4) и уксусной кислоты (5)

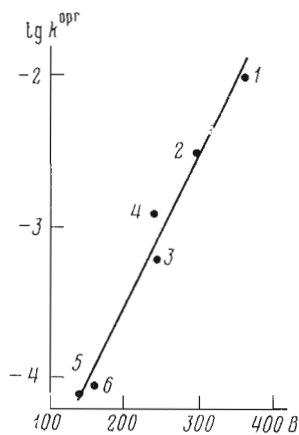


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость  $\lg k^{\text{opr}}$  от параметра общей основности растворителей  $B$ . Цифры соответствуют обозначениям растворителей на рис. 5; 6 — вода

величин в чистом растворителе невозможно, поскольку для получения азиридиниевых ионов используется хлоридрат  $N,N$ -диметил-2-фенил-2-хлорэтиламина в воде [7].

Из табл. 2 видно, что для  $\lg k^{\text{opr}}$  также не наблюдается какой-либо регулярной зависимости от диэлектрической проницаемости растворителя  $\epsilon$ . Одновременно обнаруживается линейная зависимость между величинами  $\lg k^{\text{opr}}$  и параметром общей основности растворителя  $B$  [14] (рис. 6). Следовательно, для изученной реакции соблюдается уравнение Кошеля — Пальма [14] в однопараметровой форме:

$$\lg k^{\text{opr}} = \text{const} + bB. \quad (9)$$

Обработка результатов согласно уравнению (9) дает  $\text{const} = -5,70 \pm 0,77$  и  $b = 0,011 \pm 0,003$ . Соблюдение такой корреляции показывает, что решающую роль в ускорении реакции разложения азиридиниевого иона играют основные свойства растворителя. Хотя вышеприведенные данные не позволяют судить о подробностях молекулярного механизма наблюдаемого эффекта растворителей, можно предположить, что основная сольватация стабилизирует переходное состояние процесса диссоциации связи  $C-N$  (см. реакцию (1)).

Сравнение реакций алкилирования холинэстераз и мускаринового холинорецептора показывает, что константы диссоциации комплексов азиридиниевого иона с этими белками мало различаются (см. табл. 1). Следовательно, исходные состояния реакции алкилирования обладают весьма близкими свойствами. Это возможно при сходстве физико-химических факторов, определяющих эффективность связывания реагента с белками. В данном случае это свидетельствует об одинаковых гидрофобных свойствах окружения анионных центров молекул фермента и рецептора. Поэтому неодинаковые скорости алкилирования холинэстераз и холинорецептора можно объяснить различиями переходных состояний реакции образования карбониевого иона. По результатам сольволиза, переходное состояние данной реакции стабилизируют растворители с основными свойствами. Следовательно, можно предполагать, что функциональные группы активной поверхности холинорецептора обладают более основными свойствами, чем остатки аминокислот, входящие в состав активного центра ацетилхолинэстераз. Это возможно при неодинаковом химическом строении центра

связывания азиридиновых ионов этими белками. Так, например, молекула холинорецептора, по всей вероятности, не содержит каталитического подцентра, участвующего в процессе гидролиза субстрата. Полученные результаты можно объяснить также разной доступностью этих центров молекулам воды, способным взаимодействовать с молекулой модификатора либо гидратировать функциональные группы белка вблизи центра связывания. Такая гидратная вода, конкурируя за нуклеофильные остатки белка, влияет на их взаимодействие со связанным в активном центре лигандом, уменьшая скорость реакции алкилирования. При этом алкилирование холинэстераз протекает практически с одинаковой скоростью с разложением N,N-диметил-2-фенилазиридиния в водной среде, что не противоречит последнему предположению.

### Экспериментальная часть

Методика получения мембраносвязанных препаратов ацетилхолинэстеразы и мускаринового холинорецептора коры больших полушарий мозга крысы описана ранее в работе [16]. Ацетилхолинэстеразу из яда кобры *Naja naja oxiana* очищали гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-100 согласно [17]. Препарат ацетилхолинэстеразы электрического органа электрического угря получен от фирмы Sigma (США). Для стабилизации раствора этого белка использовали альбумин сыворотки крови человека (Reanal, Венгрия) в концентрации 1 мг/мл. Растворы N,N-диметил-2-фенилазиридиния в реакционном буфере приготавливали из гидрохлорида N,N-диметил-2-фенил-2-хлорэтиламина непосредственно перед экспериментом. Применявшиеся при этом вещества и методика описаны ранее [7]. В этой же работе была подробно изучена кинетика реакции образования азиридинового иона. Это позволило нам рассчитать время, необходимое для количественного превращения использованного 2-хлорэтиламина в азиридиновое соединение. Использованные фосфорорганические соединения получены ранее в нашей лаборатории, методика очистки и их свойства в случае O,O-диэтил-n-нитрофенилфосфата описаны в работе [18], в случае метилсульфометилата O,O-диэтил-S-(β-этилмеркаптоэтил) тиофосфата — в работе [19]. 5,5'-Дитиобис-2-нитробензойную кислоту (Australal Präparate, Австрия) и ацетилтиохолин иодистый марки х.ч. дополнительно не очищали. Органические растворители использовали после ректификации, как описано в руководстве [20]. Остальные реактивы и соли марки ос.ч. или ч.д.а. использовали без дополнительной очистки. Все растворы приготавливали в бидистиллированной воде.

Реакцию ацетилхолинэстераз ионами азиридиния проводили при pH 7,5 и 25°С в 0,15 М фосфатном буфере. Подробно методика измерения кинетики алкилирования холинэстераз описана в работе [7]. Остаточную активность ферментов в реакции с азиридиновым ионом определяли по скорости гидролиза ацетилтиохолина известным спектрофотометрическим методом [21] на спектрофотометре Perkin-Elmer-402 (Англия). Искомые кинетические параметры уравнения (5) рассчитывали методом наименьших квадратов на ЭВМ «Наури-3-2». Некоторые детали математической обработки кинетических данных обсуждены в работе [7].

Определение мускаринового холинорецептора по связыванию [<sup>3</sup>H]хинуклидинилбензилата (Amersham, Англия) методом фильтрации стеклофиберными фильтрами (Whatman, Англия) описано Ямамурой и Снайдером [9]. Использованные в нашей лаборатории реактивы и приборы приведены в работе [16]. В отличие от обычного метода определения мускаринового холинорецептора в условиях равновесного связывания [<sup>3</sup>H]хинуклидинилбензилата в настоящей работе пробы фильтровали в строго определенных моменты времени в начальном периоде реакции связывания лиганда, что позволило определить начальную скорость комплексообразования.

К пробам реакционной смеси добавляли после их 10-кратного разбавления [<sup>3</sup>H]хинуклидинилбензилат до конечной концентрации 2 нМ. Затем из полученного раствора в течение 1,5–3 мин отбирали три аликвоты,

которые пропускали при одновременном разбавлении ледяным буфером через стекловолоконные фильтры. Далее фильтры обрабатывали как при обычном методе определения рецептора в условиях равновесного связывания радиоактивных лигандов [16] и измеряли связанную фильтром радиоактивность. Неспецифическое связывание [ $^3\text{H}$ ]хинуклидинилбензилата с мембранами мозга определяли в тех же условиях в присутствии 2 мкМ атропинсульфата [9]. Начальную скорость образования комплекса [ $^3\text{H}$ ]хинуклидинилбензилата с мускариновым холинорецептором вычисляли из наклона линейной зависимости концентрации специфически связанного радиоактивного лиганда от времени нанесения аликвотов реакционной смеси на фильтры. Оказалось, что в отличие от специфического связывания уровень неспецифического связывания радиоактивности с фильтрами фиксируется очень быстро и начальную скорость образования комплекса рецептор — лиганд можно определить также по общему связыванию. Определяемая начальная скорость комплексообразования прямо пропорциональна концентрации активного рецептора.

Кинетику спонтанного разложения ионов азиридиния изучали спектрофотометрическим методом по уменьшению оптической плотности раствора при  $\lambda$  269,5 нм [7]. Исходная концентрация ионов азиридиния в реакционной среде не превышала 1 мМ. Было показано, что реакции сольволиза подчиняются кинетике первого порядка. Время контроля составляло не менее 4 $\tau$ . Константы скорости реакций первого порядка рассчитывали беспараметровым методом Рудакова [22], проводя статистическую обработку на ЭВМ «Искра-1256».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Nachmanson D., Wilson I. B.* Adv. Enzymol., 1951, v. 12, p. 259–339.
2. *Abramson F. B., Barlow R. B., Mustafa M. G., Stephenson R. P. J.* Pharmacol., 1969, v. 37, № 1, p. 207–233.
3. *Cohen J. A., Oosterbaan R. A.* Нв. Exper. Pharmacol., 1963, v. 15, p. 300–373.
4. *Chapman N. B., Triggle D. I. J.* Chem. Soc., 1963, v. 265, p. 1385–1400.
5. *Heilbronn E., Bartfai T.* Progress in Neurobiol., 1978, v. 11, № 3–4, p. 171–188.
6. *Purdie J. E., Heggie R. M.* Can. J. Biochem., 1970, v. 48, № 3, p. 244–250.
7. *Palumaa P., Mähar A., Järv J.* Bioorgan. Chem., 1982, v. 11, № 4, p. 394–403.
8. *Волкова Р. И., Кочерова Л. М.* Биооргани. химия, 1977, т. 3, № 11, с. 1539–1552.
9. *Yatamura H. J., Snyder S. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 7, p. 1725–1729.
10. *Rang H. P.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1967, v. 144, № 2, p. 756–767.
11. *Young J. M., Hilley R., Burgen A. S. V. J.* Pharm. and Pharmacol., 1972, v. 24, № 10, p. 950–954.
12. *Robinson D. A., Taylor J. G., Young J. M. J.* Pharmacol., 1975, v. 53, № 3, p. 363–370.
13. *Järv J., Hedlund B., Bartfai T. J.* Biol. Chem., 1979, v. 254, № 13, p. 5595–5598.
14. *Пальм В. А.* Основы количественной теории органических реакций. Л.: Химия, 1977, 359 с.
15. *Belleau B., Tani H.* Mol. Pharmacol., 1966, v. 2, № 5, p. 411–422.
16. *Лангел Ю. Л., Ринкен А. А., Тяхельд Л. Я., Яре Я. Л.* Нейрохимия, 1982, т. 1, № 4, с. 343–351.
17. *Raba R., Aaviksaar A., Siigur J.* Eur. J. Biochem., 1979, v. 96, p. 151–158.
18. *Яре Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Лангел Ю. Л., Паст У. Э.* Биохимия, 1976, т. 41, № 5, с. 827–835.
19. *Яре Я. Л., Аавиксаар А. А., Лобанов Р. И., Годовиков Н. Н.* Изв. АН СССР. Сер. хим., 1976, № 2, с. 426–428.
20. *Protiva M.* In: Laboratorni technika organicke chemie / Keil V. Praha: Naklad. Československe Akademie Véd., 1963.
21. *Ellman G. L., Courtney K. D., Andre Jr. V., Featherstone R. M.* Biochem. Pharm., 1961, v. 7, № 1, p. 88–95.
22. *Рудаков Е. С.* Кинетика и катализ, 1960, т. 1, вып. 2, с. 177–187.

Поступила в редакцию  
14.1.1983



KINETICS OF THE REACTION OF N,N-DIMETHYL-2-PHENYLAZIRIDINIUM  
IONS WITH MUSCARINIC RECEPTOR AND ACETYLCHOLINESTERASES

PALUMAA P. J., KÄÄMBRE T. H., JÄRV J. L.

*Tartu State University, Tartu*

Kinetics of the reaction of N,N-dimethyl-2-phenylaziridinium ions with soluble acetylcholinesterases from cobra venom and electric eel as well as with the membrane-bound acetylcholinesterase and the muscarinic acetylcholine receptor from the cerebral cortex of rat brain was investigated at pH 7,5 and 25° C in 0,15 M phosphate buffer. The inhibition reaction involves the non-covalent binding step followed by the irreversible alkylation step. The spontaneous hydrolysis of the aziridinium compound and the reversible inhibition of the enzymes with the hydrolytic product were taken into account in data treatment. The aziridinium ions were found to bind with similar effectiveness in the active centers of acetylcholinesterases and the muscarinic acetylcholine receptor, however, for the latter the alkylation step is more than 40-fold faster. This difference can be explained by different solvation effects exerted by the active centers of these proteins. The rate constants of the protein alkylation reaction are compared with the kinetic data for decomposition reaction of the aziridinium ion in several solvent-water mixtures, studied separately in the case of five solvents. The basicity of the solvents was found to be the most important factor accelerating the solvolysis.