

УДК 547.435+577.153.4

ХИМИЯ

Л. А. КУНДРЮЦКОВА, Н. А. МИХАЙЛОВА, И. Е. СУХОВА,
С. В. БОГАТКОВ, Е. М. ЧЕРКАСОВА

**ИНГИБИРОВАНИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ НЕКОТОРЫМИ СЛОЖНЫМИ
ЭФИРАМИ АМИНОСПИРТОВ**

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 7 VII 1970)

Несмотря на то, что вопросу о механизме действия местных анестетиков (^{1, 2}) посвящено большое количество работ, он остается недостаточно выясненным. В то же время известно, что многие анестетики активно взаимодействуют с различными ферментами, в том числе с холинэстеразами (^{3, 4}). В данной работе было впервые изучено взаимодействие бензоатов аминоспиртов $C_6H_5COOC(Ar)(R)(CH_2)_nNR_2'$ (I — VIII) и ряда их аналогов с бутирил холинэстеразой (КФ 3.1.1.8) (ХЭ). Эти соединения обладают двумя реакционными центрами в молекуле, что, согласно литературным данным, должно усиливать их фармакологическую активность и антихолинэстеразные свойства (^{5, 6}). Кроме того, некоторые из них обладают заметной анестетической активностью (⁷).

Уже в результате предварительных опытов было найдено, что характер взаимодействия этих веществ с ХЭ резко зависит от структуры аминоспиртовой части — от Ar и R. Так, сложные эфиры первичных спиртов

Таблица 1
Константы ингибирования гидролиза бутирилхолина сывороточной ХЭ
(условия см. в тексте)

Соединение	pK _a	K _I · 10 ^{6*} , мол/л
I. C ₆ H ₅ COOCH(C ₆ H ₅)CH ₂ N(CH ₃) ₂	7,72	1,2 ± 0,2
II. C ₆ H ₅ COOCH(C ₆ H ₅)CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	8,33	0,74 ± 0,02
III. C ₆ H ₅ COOCH(C ₆ H ₅)CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	9,02	1,4 ± 0,1
IV. C ₆ H ₅ COOCH(C ₆ H ₅)CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	9,56	0,88 ± 0,07
V. C ₆ H ₅ COOCH(C ₆ H ₅)CH ₂ CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	9,22	2,2 ± 0,1
VI. C ₆ H ₅ COOC(C ₆ H ₅)(C ₂ H ₅)CH ₂ N(CH ₃) ₂	7,90	2,39 ± 0,05
VII. C ₆ H ₅ COOC(C ₆ H ₅)(C ₂ H ₅)CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	9,02	2,3 ± 0,1
VIII. C ₆ H ₅ COOCH ₂ CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	8,85	~130
IX. C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	10,06	26 ± 2
X. C ₆ H ₅ CH(OH)CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	9,68	~130
XI. C ₆ H ₅ COOCH(C ₂ H ₅)C ₆ H ₅	—	>200
Смесь C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ и C ₆ H ₅ COOCH(C ₂ H ₅)C ₆ H ₅	—	26 ± 3

* В пересчете на протонированную форму.

(Ar = R = H) гидролизуются холинэстеразой, а ингибиторные свойства проявляют лишь в концентрациях 10⁻⁴ — 10⁻³ мол/л (см. табл. 1). Напротив, сложные эфиры вторичных и третичных спиртов (Ar = C₆H₅, R = H, C₂H₅) (I — VII) совершенно не гидролизуются ХЭ и проявляют ингибиторные свойства уже в концентрациях ~ 10⁻⁶ мол/л. На ряде примеров (I, III, VI) нами было найдено, что скорость гидролиза бутирилхолина (БХ) в присутствии ингибиторов не зависит от времени их пред-

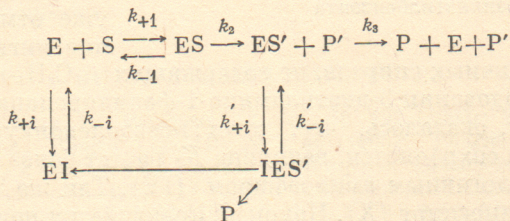
варительной инкубации с ХЭ (от 1 до 20 мин.) (см. рис. 1), что подтверждало обратимый характер ингибирования.

Далее мы провели исследование зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (БХ) и ингибиторов. Оказалось, что величина V_0/V_I в пределах точности эксперимента не зависит от концентрации субстрата (рис. 2), что, как известно, характерно для неконкурентного ингибирования (6). Для проверки мы использовали зависимости $1/\bar{V} - 1/[S]$. Оказалось, что в большинстве случаев линии на графиках пересекаются на оси абсцисс (рис. 3) или несколько выше, но довольно близко к ней (рис. 4). Это подтверждает, что в пределах точности нашего эксперимента характер ингибирования неотличим от неконкурентного. Наконец, величины K_I вычисленные по формуле (4) для неконкурентного ингибирования

$$K_I = [I] / (V_0/V_I - 1), \quad (1)$$

хорошо совпадают для разных концентраций ингибитора $[I]$ и, таким образом, формально-кинетический анализ указывает на неконкурентный

характер ингибирования. Однако, с другой стороны, нужно было ожидать, что изучавшиеся нами вещества, будучи протонированными при рН 7,4, должны взаимодействовать с анионным центром ХЭ и, следовательно, конкурировать за него с БХ. Напротив, взаимодействие их с фермент-субстратным комплексом, где анионный центр закрыт катионной головкой БХ, довольно трудно себе представить. Одним из возможных путей устранения этого является использование схемы Крупки и Лейдлера (8), предложенной ими для разновидности смешанных ингибиторов, взаимодействующих со свободным ферментом и с ацил-ферментом и не взаимодействующих с комплексом Михаэлиса:



Реакция ингибитора с ацил-ферментом с образованием тройного комплекса IES' может препятствовать деацилированию; степень этого торможения характеризуется коэффициентом α . Согласно схеме, скорость реакции в присутствии ингибитора выражается уравнением (2):

$$V_I = k_2 [E]_0 [S] / \left[K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S] \left\{ 1 + \frac{\bar{k}_2 (1 + \beta \bar{K}_i [I])}{k_3 (1 + \alpha \beta \bar{K}_i [I])} \right\} \right], \quad (2)$$

где $\beta \bar{K}_i = k_{+i}' / (k_{-i}' + \alpha k_3)$. Поскольку для ХЭ в случае субстратов типа БХ, согласно (9), определяющей скорость стадией является деацилирование ($k_3 \ll k_2$), то, если предположить, что α заметно меньше 1 и что $K_I = K_I'^*$, выражение в фигурных скобках можно упростить до

* Мы понимаем под K_I величину k_{-i} / k_{+i} — обратную использованной в (8).

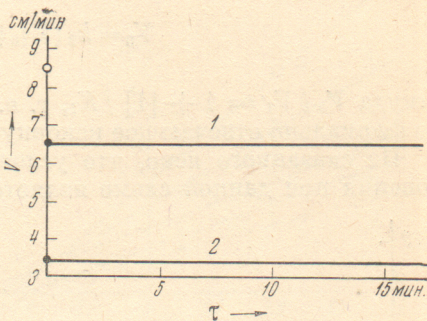


Рис. 1. Зависимость V от τ при ингибировании холинэстеразы хлоридом 3-диэтиламино-1-фенилпропилбензоата, $V_0 = 8,43$ см/мин, $V_I = 6,60$ см/мин, $C = 5 \cdot 10^{-6}$ мол/л (1); $V_I = 3,34$ см/мин, $C = 3 \cdot 10^{-5}$ мол/л (2)

$\frac{k_2}{k_3} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$, тогда

$$V_I = k_3 [E]_0 [S] / \left(K_M \frac{k_3}{k_2} + [S] \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right). \quad (3)$$

Скорость без ингибитора равна

$$V_0 = k_3 [E]_0 [S] / \left(K_M \frac{k_3}{k_2} + [S] \right), \quad (4)$$

откуда $V_0 / V_I = 1 + [I] / K_I$, т. е. мы получаем выражение, действительно формально отвечающее неконкурентному ингибированию.

Из сказанного ясно, что условием наличия неконкурентного ингибирования при данной схеме является вызываемое ингибитором существенное затруднение деаци-

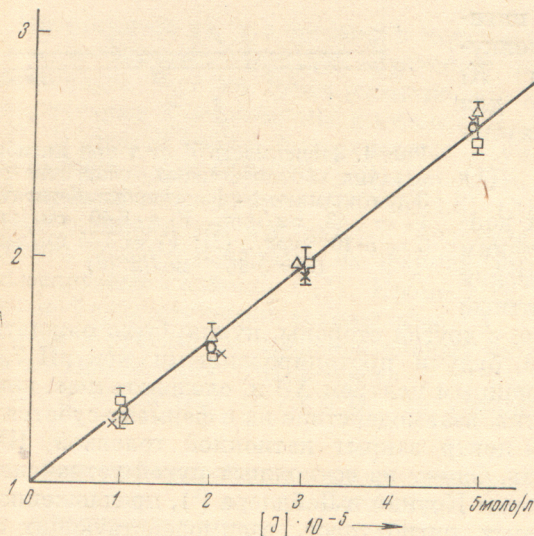


Рис. 2. Зависимость V_0 / V_I от I при ингибировании холинэстеразы хлоридом 2-диметиламино-1-этил-1-фенилэтилбензоата

ное затруднение деацилирования ($\alpha \ll 1$). Это не имеет места в случае простых аммониевых ионов, и для подобного ингибитора требуется наличие, наряду с катионным, еще хотя бы одного реакционного центра, характеризующегося повышенной электронной плотностью (8, 10). В изучавшихся нами веществах (I — VII) имеются два таких центра — C_6H_5 - и C_6H_5COO -группы. Сравнение с модельными объектами показывает, что удаление любого из них существенно снижает ингибирующее действие соединения. Так, выше уже отмечалось ослабление ингибиторных свойств

в бензоатах первичных спиртов, не содержащих α - C_6H_5 -группы (например VIII). При исследовании 3-диэтиламино-1-фенилпропана (IX), лишённого C_6H_5COO -группы, оказалось, что, хотя псевдонеконкурентный характер ингибирования и сохраняется, величина K_I растет более чем на порядок по сравнению с аналогичным аминоэфиром (IV). Так же малоактивен соответствующий аминоспирт (X). Наконец, практически полностью пропадают ингибиторные свойства при удалении из молекулы катионного центра. Так, бензоат фелин-этил-карбинола (XI) в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ мол/л совершенно не подавляет активности ХЭ (дальнейшее увеличение концентрации было невозможно из-за малой растворимости). При совместном использовании (IX) и (XI) ингибиторные свойства определяются только присутствием амина (IX) (табл. 1). Это говорит о том, что для эффективного ингибирования необходимо именно сочетание реакционных центров в одной молекуле, т. е. ингибитор должен быть бифункциональным, тогда он может одновременно и связываться с анионным центром и подавлять деацилирование.

Конечно, предложенное объяснение не единственно возможное и наблюдаемые факты могут быть связаны с каким-либо другим механизмом, например с аллостерическим взаимодействием. В любом случае, однако, необходимо иметь в виду определяющую роль бифункциональности молекулы в действии ингибиторов изученного типа.

Методика эксперимента. Кинетика гидролиза БХ с ХЭ в присутствии ингибиторов (I—XI) изучалась при 25° и pH 7,4 в присутствии фосфатного буфера ($0,95 \cdot 10^{-3}$ M Na_2HPO_4 и $0,05 \cdot 10^{-3}$ M KH_2PO_4 *). В качестве фермента применялась сывороточная ХЭ (НИИ вакцин и сывороток им. Мечникова, класс V, удельная активность 1 е/мг), субстратом служил бутирилхолин иодистый х. ч. (СНЕМАРПОЛ) (т. пл. 86°). Контроль скорости реакции осуществлялся pH-

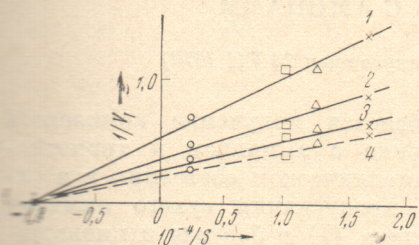


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость $1/V_I$ от $1/S$ при ингибировании холинэстеразы хлоргидратом 2-диметиламино-1-этил-4-фенилэтилбензоата. 1 — $[I] = 5 \cdot 10^{-5}$ мол/л, 2 — $2 \cdot 10^{-5}$, 3 — $1 \cdot 10^{-5}$ мол/л, 4 — $[I] = 0$

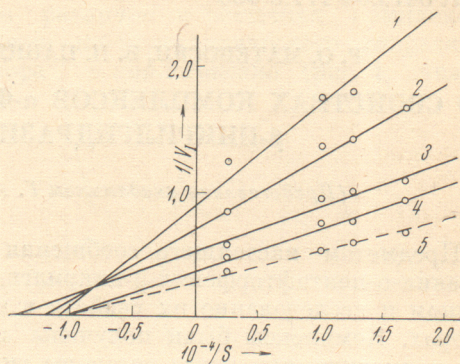


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость $1/V_I$ от $1/S$ при ингибировании холинэстеразы хлоргидратом 2-диэтиламино-1-фенилэтилбензоата: 1 — $[I] = 2 \cdot 10^{-5}$ мол/л, 2 — $1 \cdot 10^{-5}$, 3 — $5 \cdot 10^{-6}$, 4 — $2,5 \cdot 10^{-6}$ мол/л, 5 — $[I] = 0$

статным методом (прибор ЛПМ-60М) с записью на потенциометре ЭПП-09. При помощи двухшприцевой установки⁽⁶⁾ в реакционную смесь одновременно вводились эквивалентные количества субстрата и щелочи, что обеспечивало прохождение реакции по псевдонулевому порядку. Синтез соединений, использовавшихся в качестве ингибиторов, описан в⁽¹¹⁾.

Московский институт
тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова

Поступило
22 VI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Y. Büchi, X. Perlia, *Farmaco. Ed. Sci.*, **18**, 197 (1963); H. Schöenenberger, R. Brinkman, *Pharm. Ztg.*, **110**, № 2, 40 (1965); *Pharm. Acta Helv.*, **44**, 691 (1969). ² Н. Т. Прянишникова, Н. А. Шаров, *Тримеканн, Фармакология и клиническое применение*, Л., 1967. ³ F. F. Foldes et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5149 (1955); *J. Am. Med. Assoc.*, **172**, 1493 (1960). ⁴ E. Schnurr, *Arzneimittel-Forsch.*, **17**, 1577 (1967); K. Mueller, *Promotionsarbeiten*, № 3620, 185 (1965). ⁵ Р. Барлоу, *Введение в химическую фармакологию*, ИЛ, 1959. ⁶ В. А. Яковлев, *Кинетика ферментативного катализа*, «Наука», 1965. ⁷ Е. М. Черкасова, А. А. Баландин, *ДАН*, **154**, 1409 (1964). ⁸ R. M. Krupka, K. J. Laidler, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1458 (1961). ⁹ Р. И. Волкова, *Биохимия*, **32**, 1255 (1967). ¹⁰ D. S. Master-son, S. L. Friess, B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5687 (1958). ¹¹ И. Н. Назаров, Е. М. Черкасова, Г. С. Ермакшвили, *Изв. АН СССР, ОХН*, **1959**, 1605, 1960, 1820; *ЖОХ*, **25**, 1536 (1955).

* В случае (XII) реакция проводилась в присутствии 4% этилового спирта для обеспечения гомогенности. Согласно⁽⁹⁾, это существенно не меняло активности ХЭ.