

УДК 577.153

БИОХИМИЯ

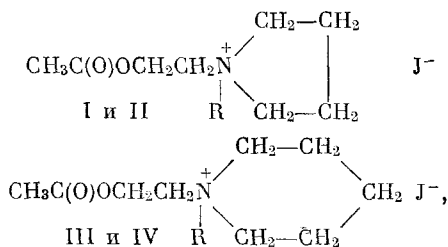
Е. В. РОЗЕНГАРТ, И. Н. СОБОЛЕВА, М. Л. ИНДЕНБОМ,
Л. Н. ТИХОНОВА, Н. В. ХРОМОВ-БОРИСОВ

НОВЫЙ СПЕЦИФИЧЕСКИЙ СУБСТРАТ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

(Представлено академиком Е. М. Крепом 7 VIII 1972)

Субстратная специфичность ацетилхолинэстеразы (АХЭ, КФ 3.1.1.7) и холинэстеразы (бутилхолинэстеразы, БУХЭ, КФ 3.1.1.8) изучена с использованием многих десятков сложных эфиров различного строения (¹). Из всего многообразия исследованных соединений только ацетил-β-метилхолин (АМХ) оказался специфическим субстратом АХЭ (²): он гидролизовался под действием АХЭ бычьих эритроцитов в 30 раз быстрее, чем под действием БУХЭ лошадиной сыворотки (^{3, 4}). Благодаря этому АМХ стал одним из основных субстратов при идентификации холинэстераз различного происхождения.

Ранее было показано (⁵), что в результате постепенной замены метильных радикалов в катионной группировке ацетилхолина (АХ) на этильные происходит заметное снижение скорости гидролиза под действием БУХЭ, в то время как скорость гидролиза под действием АХЭ почти не меняется. Поскольку возможность и степень гидрофобного взаимодействия радикалов, входящих в аммониевую группировку АХ, зависит не только от их величины, но и от их конформационных возможностей, мы решили синтезировать и исследовать аналоги АХ, содержащие в катионной части молекулы пирролидиниевые и пиперидиниевые группировки (соединения I, II, III и IV):



где R = CH₃ (I и III) или C₂H₅ (II и IV).

Синтез соединений I, II, III (⁶) и IV (⁶) проводился следующим образом: при ацилировании хлористым ацетилом N-(β-оксиэтил)-пиперидина (⁷) и N-(β-оксиэтил)-пирролидина (⁸) в абсолютном бензоле получали N-(β-ацетоксиэтил)-пиперидин (выход 70–75%) и N-(β-ацетоксиэтил)-пирролидин (⁹) (выход 72–79%), которые подвергали йодалкилированию без растворителя. Аналитические данные и свойства полученных соединений приведены в табл. 1. В качестве источников ферментов использованы очищенный препарат БУХЭ сыворотки крови лошади (Институт им. Мечникова, Москва) и водорастворимый препарат АХЭ бычьих эритроцитов (завод медпрепаратов, мясокомбинат им. Кирова, Ленинград). Холинэстеразную активность определяли потенциометрическим методом (³). Кинетические параметры реакции (константу

Михаэлиса K_M и максимальную скорость V) определяли либо графическим ⁽³⁾, либо аналитическим ^(10, 11) методами. Активность каталитического центра фермента (a_c) по отношению к изученным субстратам рассчитывали по формуле ⁽³⁾: $a_c = V/[E]$, где E — концентрация активных центров фермента, вычисленная на основании параметров гидролиза АХ: $a_c(\text{БуХЭ}) = 6 \cdot 10^4 \text{ мин}^{-1}$ ⁽¹²⁾, $a_c(\text{АХЭ}) = 3 \cdot 10^5 \text{ мин}^{-1}$ ⁽³⁾.

Как видно из табл. 2, в реакциях с участием АХЭ субстратные характеристики изученных соединений были близки к АХ: величины a_c оказались лишь немногим ниже; высокие концентрации этих ацетатов

Таблица 1

Аналитические данные и свойства исследованных соединений

№ соединения	Растворитель для кристаллизации, т. пл.	Выход, %	Найдено, %				Брутто-формула	Вычислено, %			
			С	Н	Н	О		С	Н	Н	О
I	Метанол + абс. эфир, очень гигроскопичен	92,5	35,05	5,97	4,87	43,79	$C_9H_{18}NO_2$	36,12	6,06	4,68	42,44
II	Изопропиловый спирт, очень гигроскопичен	87,5	38,60	6,35	4,90	40,80	$C_{10}H_{20}NO_2$	38,62	6,43	4,47	40,52
III	Изопропиловый спирт, 106—108°	97	38,61	7,10	4,46	40,62	$C_{10}H_{20}NO_2$	38,62	6,43	4,47	40,52
IV	Изопропиловый спирт, 86—88°	40	40,83	7,04	4,25	38,80	$C_{11}H_{22}NO_2$	40,37	6,78	4,28	38,78

Таблица 2

Кинетические параметры гидролиза исследованных производных АХ под действием АХЭ бычьих эритроцитов и БуХЭ лошадиной сыворотки (рН 7,2; 25°)

Субстраты	АХЭ		БуХЭ		$a_c(\text{АХЭ})/a_c(\text{БуХЭ})$
	$a_c, \text{мин}^{-1}$	K_M, M	$a_c, \text{мин}^{-1}$	K_M, M	
$CH_3C(O)OCH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$ ^(3, 12)	$3 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-3}$	5
I	$2,5 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	20
II	$2,5 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$3,2 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	8
III	$1,9 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^{-5}$	65
IV	$1,6 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	8
$CH_3C(O)OCH(CH_3)CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$ ^(3, 4)	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^3$	$7 \cdot 10^{-4}$	30

тормозили активность АХЭ; величины оптимальной концентрации субстратов были также одного порядка. Таким образом, заключение аммониевого азота в насыщенный цикл практически не сказалось на свойствах этих соединений как субстратов АХЭ.

Совсем иную картину представляют реакции с участием БуХЭ. Величина a_c для соединения I была в 5 раз, а для соединения III — даже в 20 раз ниже, чем для АХ. Более низкие значения величин K_M (по сравнению с АХ) связаны, видимо, с так называемой непродуктивной сорбцией этих веществ на активной поверхности БуХЭ ⁽⁶⁾. Таким образом, в случае БуХЭ заключение аммониевого азота в насыщенный цикл снижало скорость гидролиза, причем расширение цикла (переход от пирролидиневого к пиперидиниевому производному) усугубляло этот эффект.

Оказалось, что метилаты I и III гидролизались под действием БУХЭ медленнее, чем не содержащие гетероциклов метилаты с «утяжеленной» катионной группировкой типа NEt_2Me (⁵). Вследствие гибкости этильных радикалов расстояние между β -углеродными атомами этилов может изменяться в пределах от 2,5 до 5 Å (рис. 1а). Если же азот включен в 5- или 6-членный гетероцикл (рис. 1б), то это расстояние зафиксировано и равно приблизительно 2,5 Å. Вследствие этого повышается вероятность образования ван-дер-ваальсовых связей с гидрофобным участком, составляющим непосредственное обрамление анионного центра фермента. У БУХЭ этот участок играет относительно большую роль, чем у АХЭ (¹³). Поэтому, вероятно, метилаты I и, особенно, III отличаются весьма заметным снижением скорости гидролиза под действием БУХЭ.

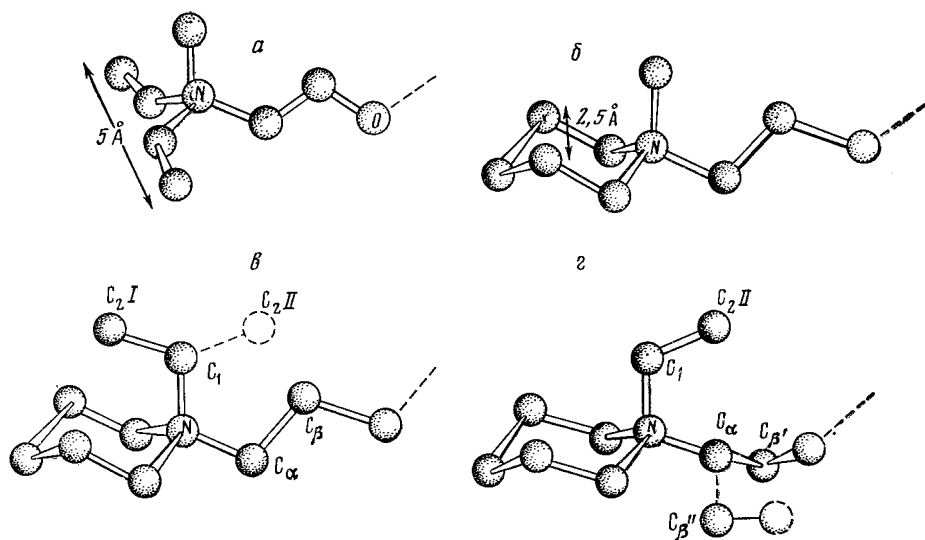


Рис. 1

Если в метилатах I и III заменить метильные радикалы в аммониевой группировке на этильные (этилаты II и IV), то весьма существенным образом ограничатся конформационные возможности «холиновой» части молекулы. В этилатах расположение C_α и C_β , изображенное на рис. 1в, возможно только при положении углерода C_2 , близком к C_{2I} . Поворот этильного радикала в сторону C_{2II} неизбежно приведет к смещению C_β в положение $C_{\beta'}$ или $C_{\beta''}$ (рис. 1г). Это должно повлиять на возможности образования контактов β -углеродных атомов (кольца и цепочки) с гидрофобным окружением анионного центра фермента. По-видимому, вследствие этого этилаты II и IV оказались лучшими субстратами БУХЭ, чем их метильные аналоги I и III.

Количественной мерой специфичности субстратов может служить отношение $a_c(\text{АХЭ})/a_c(\text{БУХЭ})$. Эта величина приведена в табл. 2. Для сравнения в табл. 2 представлены параметры ферментативного гидролиза АМХ. Оказалось, что по специфичности соединения I сопоставимо с АМХ, а подметилат N-ацетоксиэтилпиперидиния (соединение III) даже превосходит АМХ в 2 раза. Преимущество соединения III перед АМХ заключается в том, что при одинаково низкой (в 20 раз ниже, чем АХ) скорости гидролиза под действием БУХЭ, расщепление подметилата N-ацетоксиэтилпиперидиния под действием АХЭ протекало в 2 раза быстрее, чем АМХ, и практически скорость этой реакции соизмерима со скоростью гидролиза АХ. Кроме того, в отличие от соединения III АМХ оптически активен, причем его D-изомер не гидролизуются под

действием АХЭ (¹⁴), и поэтому общую скорость ферментативного гидролиза определяет соотношение изомеров в препарате сложного эфира.

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР

Поступило
28 VII 1972

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Н. Голиков, В. И. Розенгарт, Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества, Л., 1964. ² G. A. Alles, R. C. Hawes, J. Biol. Chem., **133**, 375 (1940). ³ В. А. Яковлев, Кинетика ферментативного катализа, «Наука», 1965. ⁴ А. П. Бресткин, Д. Л. Певзнер, Биохимия, **36**, 81 (1971). ⁵ Р. Барлоу, Введение в химическую фармакологию, М., 1959, стр. 190. ⁶ А. П. Бресткин, Е. В. Розенгарт и др., ДАН, **205**, № 3 (1972). ⁷ A. Ladenburg, Ber., **14**, 1877 (1881). ⁸ X. М. Вассерман, Сборн. научн. работ мед. инст., Рига, в. 5, 23 (1956). ⁹ R. W. Brimblecombe, D. G. Rowsell, Int. J. Neuropharmacol., **8**, 131 (1969). ¹⁰ И. Н. Соболева, В. А. Самокиш, Е. В. Розенгарт, Биохимия, **34**, 1173 (1969). ¹¹ A. P. Brestkin, E. V. Rozengart et al., Biochim. et biophys. acta, **191**, 155 (1969). ¹² А. П. Бресткин, И. Л. Брик, Биохимия, **32**, 3 (1967). ¹³ М. И. Кабачник, А. А. Абдувахабов и др., Усп. хим., **39**, 1050 (1970). ¹⁴ A. H. Veskett, N. J. Harper, J. W. Clitherow, J. Pharm. Pharmacol., **15**, 362 (1963).