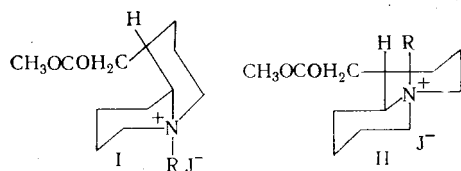


А. А. АБДУВАХАВОВ, Ш. К. КАСЫМОВ, Е. В. РОЗЕНГАРТ,  
И. Н. СОБОЛЕВА, Х. А. АСЛАНОВ, академик А. С. САДЫКОВ

### СУБСТРАТЫ ХОЛИНЭСТЕРАЗ НА ОСНОВЕ ЛУПИНИНА И ЭПИЛУПИНИНА

Проблема метаболизма производных лупинина в животном организме включает многие ферментативные процессы (алкилирование, ацилирование, гидролиз и др.). С этой точки зрения исследование холинэстеразного гидролиза производных лупинина является одним из этапов изучения их метаболических превращений. Кроме того, представляет интерес синтез и исследование в качестве субстратов холинэстераз производных лупинина и его эписмера. Использование таких рядов в методе субстратного анализа может дать дополнительную информацию о структуре активной поверхности и механизма холинэстеразного гидролиза (<sup>1</sup>).

Были синтезированы и изучены два ряда ацетатов на основе лупинина и эпилупинина. Каждый ряд включает ацетаты свободного основания, а также N-метил-, N-этил- и N-пропил-производных. В связи с тем, что величина  $pK_a$  для лупинина (по аналогии с N-метилпиперидином) равна 10 (<sup>2</sup>), основание лупинина и эпилупинина протонировано при pH 7,5 (исследование проводили при pH 7,5) практически полностью. Поэтому все исследованные соединения являются аммониевыми производными общей формулы (I — иодалкилаты ацетиллупинина; II — подалкилаты ацетилэпилупинина).



где  $R = H, CH_3, C_2H_5, C_3H_7$

Соединения I и II получили взаимодействием лупинина и эпилупинина с хлористым ацетиллом в присутствии триэтиламина, затем действием иодистых алкилов были превращены в соответствующие иодалкилаты.

**Ферменты.** В качестве бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) использован очищенный препарат фермента из сыворотки крови лошади (Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва) с удельной активностью по ацетилхолину (АХ) 4 мкмол/мин·мг. В качестве ацетилхолинэстеразы (АХЭ) использован водорастворимый препарат, полученный из эритроцитов крови человека на заводе медицинских препаратов (Пермь) с удельной активностью по АХ 0,8 мкмол/мин·мг.

**Субстраты.** Ацетилхолин-хлорид фирмы «Мерск». Синтез остальных ацетатов описан выше. Растворы субстратов (0,2 M) готовили на дистиллированной воде, доводили до pH 7,5 непосредственно перед опытом; растворы оснований подкисляли до pH 7,5 сразу после приготовления.

Скорость ферментативного гидролиза определяли методом потенциометрического титрования (<sup>3</sup>) (25°, pH 7,5), в случае БуХЭ титровали в среде 0,07 M фосфатного буфера pH 7,5, а в случае АХЭ — в среде 0,1 M KCl. Кинетические параметры реакции (константу Михаэлиса

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

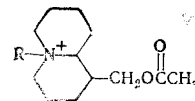
Параметры ферментативного гидролиза. Производные лупинина (I) и эпилупинина (II) были исследованы в качестве субстратов БуХЭ и АХЭ. С этой целью были определены величины константы Михаэлиса ( $K_M$ ) и рассчитаны величины активности каталитического центра фермента ( $a_c$ ) для каждого из субстратов. Полученные данные приведены в табл. 1. Как было указано выше, все полученные ацетаты являются аммониевыми производными (в том числе и основание I и II) и различаются радикалом при  $N^+$ .

При сравнении величин  $a_c$  (табл. 1) оказалось, что для БуХЭ в ряду I отмечено постепенное снижение, а в ряду II — максимум при  $R = \text{CH}_3$ , в случае АХЭ наблюдалась обратная картина: в ряду I был максимум при  $R = \text{C}_2\text{H}_5$ , а в ряду II величина  $a_c$  монотонно снижалась. Все изученные ацетаты гидролизировались под действием БуХЭ и АХЭ медленнее, чем АХ, однако, аналогично ранее исследованному производным АХ с различной структурой аммониевой группировки, относительная скорость под действием БуХЭ была меньше: так, в случае БуХЭ падение скорости по сравнению с АХ было 10–30-кратным, а в случае АХЭ только 4–7-кратным. По-видимому, и здесь действует правило, что для АХЭ определяющую роль играет наличие «катионной головки». Важную информацию дает отношение  $a_c/K_M$ , которое характеризует скорость реакции не при насыщении фермента субстратом, как в случае  $a_c$ , а при очень низких концентрациях субстрата  $[S] \ll K_M$ . Кроме того, это отношение пропорционально константе образования комплекса Михаэлиса и может характеризовать продуктивную сорбцию субстрата на активной поверхности фермента (4). Из табл. 1 видно, что, как и для АХ, эта величина в случае АХЭ в среднем на порядок выше, чем в случае БуХЭ. Интересно, что, в отличие от скорости гидролиза при высоких концентрациях субстрата (сравнение величин  $a_c$ ), в случае низких концентраций субстрата ( $a_c/K_M$ ) различий между АХЭ и БуХЭ не обнаружено, за исключением соединения II,  $R = \text{H}$  в случае БуХЭ.

Параметры непродуктивной сорбции. Ранее (4) было высказано предположение о существенном вкладе непродуктивной сорбции в общую скорость холинэстеразного гидролиза субстратов. На примере рядов ацетатов, выступающих в реакции с ферментом как одинаковые по силе ацетилирующие агенты (т. е. ацетаты с практически одинаковой прочностью сложно-эфирной связи), по уравнению Бресткина оказалось возможным оценить параметры непродуктивной сорбции (по сравнению с АХ) (4, 4). Такими параметрами являются для продуктивного связывания  $p = a_c/a_c(\text{АХ})$ , истинное значение константы Михаэлиса  $K_M^* = K_M/p$  и константа диссоциации неактивного фермент-субстратного комплекса (результат непродуктивной сорбции субстрата на активной поверхности фермента)  $K_b = K_M/(1-p)$ . Рассчитанные величины приведены в табл. 2. Из табл. 2 видно, что величины  $p$  для БуХЭ ниже, чем для АХЭ, что свидетельствует о более существенной роли непродуктивной сорбции в случае БуХЭ. Следствием этого являются более низкие значения  $K_b$  по сравнению с  $K_M^*$ , причем в случае АХЭ это различие было меньше.

Специфичность по отношению к АХЭ. Общей мерой специфичности следует считать отношения величин  $a_c$ , однако в связи с возможностью анализа процесса ферментативного гидролиза с учетом непродуктивности сорбции можно условно оценить «продуктивную» (отношение величины  $a_c/K_M$ ) и непродуктивную (отношение  $K_b$ ) составляющие специфичности. Из рассмотрения общей специфичности можно сделать ряд выводов. Во-первых, все исследованные ацетаты являются специфическими

Параметры ферментативного гидролиза ( $a_c$ ,  $K_M$ ) ацетатов

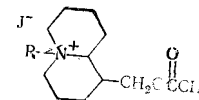


под действием БУХЭ и АХЭ

R	БУХЭ				АХЭ				$a_c/K(10^7)$			
	лупинин		эпилупинин		лупинин		эпилупинин		БУХЭ		АХЭ	
	$a_c$	$K_M$	$a_c$	$K_M$	$a_c$	$K_M$	$a_c$	$K_M$	лупинин	эпилупинин	лупинин	эпилупинин
H	$5,4 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^3$	$6,8 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^{-4}$	$7,3 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	3,4	0,13	16	16
CH <sub>3</sub>	$4,2 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$6,4 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$6,5 \cdot 10^4$	$3,2 \cdot 10^{-4}$	1,8	1,6	18	20
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	$3,6 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$4,1 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$7,0 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$6,2 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	2,4	1,9	39	44
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	$2,7 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$4,1 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$4,6 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^{-4}$	2,5	2,0	23	21
AX ( <sup>4</sup> )	$6 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^{-4}$	—	—	$3 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^{-4}$	—	—	12	—	150	—

Таблица 2

Параметры непродуктивного связывания субстратов (по уравнению Бресткина (I))



R	БУХЭ						АХЭ					
	$p$		$K_M^*$		$K_B$		$p$		$K_M^*$		$K_B$	
	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э
H	0,09	0,035	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$7,0 \cdot 10^{-4}$	0,17	0,24	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$3,7 \cdot 10^{-4}$	$5,7 \cdot 10^{-4}$
CH <sub>3</sub>	0,07	0,085	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-4}$	0,21	0,22	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,06	0,07	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$	0,23	0,21	$7,8 \cdot 10^{-3}$	$6,7 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,045	0,05	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	0,14	0,15	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^{-4}$

Примечание. Л — лупинин, Э — эпилупинин.

субстратами АХЭ (отношение  $a_c(\text{АХЭ})/a_c(\text{БуХЭ})$  значительно больше единицы), во-вторых, все они более специфические субстраты АХЭ, чем АХ, в-третьих, наиболее специфичным для АХЭ оказался II, R=H, для которого величина отношения  $a_c$  (35) сопоставима с величиной этого отношения для такого специфического субстрата АХЭ, как ацетил β-метилхолин (30) (5), и в 7 раз выше, чем у АХ.

Продуктивная составляющая специфичности также наибольшая у I, R=H (52), причем она не только превышает величину отношения  $a_c/K_M$  для других исследованных ацетатов и АХ, но более чем в 2 раза превосходит эту величину для ацетил β-метилхолина (23), рассчитано по данным (5, 6). Не менее интересным является сходство исследованных ацетатов по величине «непродуктивности» составляющей специфичности. Это тем более неожиданно, так как производные АХ с различной структурой аммониевой группы (4) отличались друг от друга именно по «непродуктивности» составляющей, а отношение величины  $a_c/K_M$  было у них практически одинаковым.

Сравнение производных лупинина и эпилупинина. На основании данных и.к. и спектроскопии п.м.р. (7) установлены конформационные различия между иодметилатами I и II:  $\text{CH}_2\text{OH}$ -группа в обоих конформерах экваториальна, группа  $\text{N}^+\text{—CH}_3$  в случае I занимает аксиально-экваториальное, а в случае II — аксиально-аксиальное положение.

Интересно было выяснить влияние подобных структурных различий на субстратные свойства исследованных ацетатов, для чего были сопоставлены основные параметры ( $a_c$ ,  $a_c/K_M$ ,  $K_B$ ) для производных I и II. По величине  $a_c$  I (R=H) в 2,5 раза превосходил II (R=H) по скорости гидролиза под действием БуХЭ, а в случае АХЭ, наоборот, гидролизывался несколько медленнее. Для производных I и II с алкильным радикалом вне зависимости от его длины соотношение величин  $a_c$  было близко к 1. Параметр  $a_c/K_M$ , характеризующий скорость при низких концентрациях, давал для пары I (R=H) и II (R=H) в случае БуХЭ еще большее различие: преимущество I (R=H) было 11-кратным, во всех остальных случаях производные I и II практически не различались. Та же картина была и в случае  $K_B$ ; в этой же паре I (R=H) в 4 раза хуже сорбировался — непродуктивно. Таким образом, лишь БуХЭ чувствовала различие между I и II и только в протонированной форме. С учетом данных, приведенных здесь, видимо, можно говорить о том, что структура II (R=H) плохо соответствует активной поверхности БуХЭ: низкая величина  $a_c$ , наиболее низкая (в 5–10 раз ниже, чем у других исследованных ацетатов) величина  $a_c/K_M$ ; кроме того, это соединение характеризовалось высокими значениями величин  $K_M^*$  и  $K_B$  (см. табл. 2), что свидетельствует о плохой сорбции ацетата на активной поверхности БуХЭ (речь идет как о продуктивном, так и непродуктивном связывании).

Отдел биоорганической химии  
Академии наук УзССР  
Ташкент

Поступило  
31 X 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> А. П. Бресткин и др., ДАН, т. 205, 717 (1972). <sup>2</sup> А. Альберт, Е. Сержент, Константы ионизации кислот и оснований, Л., 1964, стр. 130. <sup>3</sup> В. А. Яковлев, Кинетика ферментативного катализа, «Наука», 1965. <sup>4</sup> А. П. Бресткин, Д. Л. Певзнер, Биохимия, т. 36, 81 (1971). <sup>5</sup> И. Н. Соболева, В. А. Самокиш, Е. В. Розенгарт, Биохимия, т. 34, 1173 (1969). <sup>6</sup> Е. В. Розенгарт и др., ДАН, т. 205, № 3 (1972). <sup>7</sup> Т. К. Касымов, Синтез и исследование некоторых производных лупинина. Автореф. канд. дисс., Ташкент, 1971.