

А. П. БРЕСТКИН, А. К. КАСЫМОВ, Е. Б. МАЙЗЕЛЬ,
Е. В. РОЗЕНГАРТ, В. Е. ГМИРО, Л. Н. ПОЗНЯКОВА,
Н. В. ХРОМОВ-БОРИСОВ

О СПЕЦИФИЧНОСТИ ТИОСУБСТРАТОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 9 II 1976)

Тиохолиновые эфиры широко используются при гистохимических и электрофоретических определениях холинэстераз. С появлением колориметрического метода Элмана они применяются и в биохимических исследованиях (¹). Так, в качестве субстратов холинэстераз были изучены ацетильный, пропионильный и бутирильный эфиры тиохолина (², ³). Недостаточно исследованным оставался вопрос о специфичности тиосубстратов. С этой целью нами изучены производные ацетилтиохолина (АТХ) с различным алкильным окружением ониевого атома азота. Были определены кинетические параметры гидролиза под действием ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и бутирилхолинэстеразы (БухЭ) для триэтиламмониевого, метилпирролидиниевого и метилпиперидиниевого производных АТХ.

Ферменты. БухЭ (КФ 3.1.1.8) из сыворотки крови лошади с удельной активностью 9,6 ед. и АХЭ (КФ 3.1.1.7) из эритроцитов человека с удельной активностью 1,0 ед. производства Пермского научно-исследовательского института вакцин и сывороток.

Субстраты. Ацетилтиохолинбромид фирмы «Chemapol» (Чехословакия). Йодметилат 2-пирролидиноэтилтиоацетата получен по методу (⁴). Для синтеза йодметилата 2-пиперидиноэтилтиоацетата смесь 3,9 г (2,0208 моля) 2-пиперидиноэтилтиоацетата (⁵), 4,7 г (0,033 моля) йодистого метила и 15 мл эфира инкубировали 2 суток при 20–25°, выпавший в осадок продукт перекристаллизовывали из изопропанола, выход 5,7 г (83%), т. пл. 133–135°.

Найдено %: С 36,46; Н 6,12; N 4,26; S 9,53; J 38,40
C₁₀H₂₂JNOS. Вычислено %: С 36,47; Н 6,08; N 4,26; S 9,73; J 38,6

Для синтеза йодэтилата 2-диэтиламиноэтилтиоацетата смесь 4,2 г (0,024 моля) 2-диэтиламиноэтилтиоацетата (т. кип. 80°/9 мм, получен взаимодействием 2-диэтиламиноэтилтиола с ацетилхлоридом в присутствии триэтиламина в соотношении 1:1:1 в бензоле), 4,5 г (0,029 моля) йодистого этила и 25 мл бензола кипятили в течение 5 час., продукт перекристаллизовывали из изопропанола, выход 2,0 г (25%), т. пл. 132–134°.

Найдено %: С 36,42; Н 6,69; J 38,18; S 10,23
C₁₀H₂₂JNOS. Вычислено %: С 36,30; Н 6,65; J 38,40; S 9,66

Ферментативную активность определяли по методу Элмана (¹). Реакционная смесь объемом 2,0 мл содержала 5·10⁻⁴ М раствор 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной)кислоты фирмы «Koch-Light Lab» (Англия) в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,5, и растворы фермента и субстрата. Изменение экстинкции при 413 нм наблюдали в термостатированной кювете фотоэлектроколориметра ФЭК-Н-57 на протяжении 1–3 мин. при 25°.

Кинетические характеристики гидролиза тиацетатов
под действием АХЭ и БуХЭ

№ соединения	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{XC}_2\text{H}_4\text{R}$	$\text{X}=\text{S}$						$\frac{a_c(\text{AXЭ})}{a_c(\text{БуХЭ})}$		$\frac{a_c(\text{X}=\text{S})}{a_c(\text{X}=\text{O})}$	
		AXЭ			БуХЭ			$\text{X}=\text{O}^{(9)}$	$\text{X}=\text{S}$	AXЭ	БуХЭ
		$a_c \cdot 10^{-4}, \text{мин}^{-1}$	$K_M \cdot 10^4, \text{M}$	$a_c/K_M \cdot 10^{-8}, \text{мин}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$	$a_c \cdot 10^{-4}, \text{мин}^{-1}$	$K_M \cdot 10^4, \text{M}$	$a_c/K_M \cdot 10^{-8}, \text{мин}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
I	$-\overset{+}{N}(\text{CH}_3)_3$	22	0,50	44	10	3,1	3,2	5	2	0,7	1,7
II	$-\overset{+}{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	6,5	2,8	2,3	1,8	5,0	0,36	10	3,5	0,3	0,9
III		14	0,33	42	1,8	0,52	3,4	20	8	0,6	1,4
IV		4,2	2,4	1,7	0,44	0,28	1,6	65	10	0,2	1,5

Таблица 2

Расчетные параметры непродуктивного связывания субстратов типа $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{XC}_2\text{H}_4\text{R}$ при гидролизе под действием АХЭ и БуХЭ (данные для ацетатов (X=O) взяты из работы (9))

R	X	АХЭ				БуХЭ			
		p	$K_M^* \cdot 10^4, \text{M}$	$K_B \cdot 10^4, \text{M}$	K_M^*/K_B	p	$K_M^* \cdot 10^4, \text{M}$	$K_B \cdot 10^4, \text{M}$	K_M^*/K_B
$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	S	1,0	0,5	—	—	1,0	3,1	—	—
	O	1,0	2,0	—	—	1,0	5,0	—	—
$-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	S	0,30	7,8	3,3	2,0	0,18	2,9	0,63	5,0
	O	0,64	4,1	7,2	0,6	0,22	7,7	2,2	2,0
	S	0,64	0,52	0,92	0,5	0,18	2,9	0,63	5,0
	O	0,83	3,1	15	0,2	0,22	7,7	2,2	3,5
	S	0,19	13	3,0	4,0	0,04	6,4	0,29	22
	O	0,64	8,0	14	0,6	0,05	8,0	0,4	20

Определение количества подвергшегося гидролизу субстрата проводили по калибровочной кривой (6). Величины констант Михаэлиса (K_M) и максимальной скорости (V) определяли графическим и аналитическим методами (7, 8). Для расчета величин активности каталитического центра ($a_c = V/[E_0]$), вычисленную на основании параметров гидролиза АТХ: $a_c(\text{БуХЭ}) = 1 \cdot 10^5 \text{ мин}^{-1}$, $a_c(\text{АХЭ}) = 2,2 \cdot 10^5 \text{ мин}^{-1}$ (3). Расчет параметров непродуктивного связывания проводили согласно (9): $p = a_c/a_c(\text{АТХ})$ — коэффициент, отражающий долю непродуктивного связывания, $K_M = K_M/p$ —

истинная величина константы Михаэлиса, $K_a = K_m / (1 - p)$ — равновесная константа диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Изменение строения аммониевой группировки сопровождалось более значительным снижением величин a_c в случае БУХЭ, чем АХЭ (табл. 1, графа 2 и 5). Например, максимальная скорость гидролиза соединения III под действием БУХЭ составляет лишь 20% от скорости гидролиза АТХ, в то время как в случае АХЭ 65%, для соединения IV имеем, соответственно, 4 и 20%. Аналогичная зависимость наблюдалась для подобных кислородных эфиров (⁹, ¹⁰). По величине отношения a_c/K_m , которое характеризует сорбционную стадию процесса ферментативного гидролиза (⁹), соединение III было близко к АТФ, а соединение II значительно уступало АТФ (табл. 1, графа 4 и 7). Этого не наблюдалось для кислородных аналогов (⁹).

При сравнении величин отношения $a_c(\text{АХЭ})/a_c(\text{БУХЭ})$, которое отражает специфичность субстратов, можно заключить, что тиопроизводные оказались значительно менее специфичными субстратами АХЭ, чем их кислородные аналоги. Эта тенденция к снижению специфичности особенно четко проявилась в случае соединения IV, кислородный аналог которого является специфичным субстратом АХЭ (¹⁰). В этом случае специфичность тиаоацетата уменьшилась в 6,5 раза, а для остальных изученных соединений — в 2,5–3 раза. Уменьшение специфичности к АХЭ наблюдалось также при сравнении кинетических параметров гидролиза пропионилхолина и пропионилтиохолина (³), а также ацетил-β-метилхолина и его тиаоаналога (²). При сопоставлении величин a_c ферментов для тиаоацетатов и ацетатов (табл. 1, графа 10 и 11) оказалось, что АХЭ гидролизовала тиаоацетаты значительно медленнее, чем соответствующие ацетаты, а БУХЭ, наоборот, с большей скоростью гидролизовала тиаоацетаты. Все это вместе привело к существенному снижению избирательности по отношению к АХЭ.

Интересен анализ ферментативного гидролиза тиаоацетатов с учетом процесса непродуктивного связывания субстрата, который играет существенную роль в холинэстеразных реакциях (⁹). Расчет параметров мы проводили при допущении, что непродуктивной сорбцией АТХ можно пренебречь (по аналогии с ацетилхолином (⁹)). Отношение истинной величины константы Михаэлиса (K_m), учитывающей лишь продуктивное связывание субстрата и его последующие превращения, к константе диссоциации «непродуктивного» фермент-субстратного комплекса (K_a) отражает влияние непродуктивного связывания субстрата на общую скорость его ферментативного гидролиза. Анализ данных, приведенных в табл. 2, позволяет высказать ряд соображений. Во-первых, как и в случае ацетатов, наибольшей склонностью к непродуктивному связыванию обладало соединение IV. Во-вторых, соотношение величин K_m/K_a для тиаоацетатов было практически таким же, как и для ацетатов. В-третьих, сами величины K_m/K_a для тиаоацетатов несколько выше, чем для ацетатов, причем эти различия более существенны в случае АХЭ. Вероятно, при ацетилхолинэстеразном гидролизе производных АТХ в большей мере, по сравнению с кислородными аналогами (⁹), сказывается роль непродуктивного связывания. Быть может, с этим и связано снижение избирательности тиосубстратов по отношению к АХЭ.

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

Поступило
31 I 1976

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. L. Ellman, R. D. Courtney et al., Biochem. Pharmacol., v. 7, 88 (1961).
- ² K.-B. Augustinsson, T. Isacsen, Acta chem. scand., v. 11, 750 (1957).
- ³ А. П. Бресткин, Ю. Г. Жуковский, Т. М. Суненкова, Биохимия, т. 39, 13 (1974).
- ⁴ J. W. Haefele, R. W. Broge, Proc. Sci. Sect. Toilet. Goods Assoc., № 32, 52 (1959); Chem. Abstr., v. 54, 17233 (1960).
- ⁵ R. J. Wineman, M. H. Gollis et al., J. Org. Chem., v. 27, 4222 (1952).
- ⁶ A. A. Dietz, H. M. Rubinstein, Clin. Biochem., v. 5, 136 (1972).
- ⁷ H. Lineweaver, D. Burk, J. Am. Chem. Soc., v. 56, 686 (1934).
- ⁸ А. Р. Бресткин, Е. В. Розенгарт et al., Biochim. et biophys. acta, v. 191, 155 (1969).
- ⁹ А. П. Бресткин, Е. В. Розенгарт и др., Биохимия, т. 40, 95 (1975).
- ¹⁰ Е. В. Розенгарт, И. Н. Соболева и др., ДАН, т. 209, 482 (1973).